



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**TESIS DOCTORAL**

**“EVOLUCIÓN CLONAL EN CÁNCER DE PULMÓN  
NO MICROCÍTICO. CARACTERIZACIÓN  
GENÉTICA/GENÓMICA Y RELACIÓN CON SUS  
CARACTERÍSTICAS ANATOMOCLÍNICAS”**

**SALAMANCA 2016  
Marta Rodríguez González**







# Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Cáncer de pulmón no microcítico.....	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. Epidemiología.....	1
1.1.3. Factores de riesgo.....	3
1.1.4. Tipos histológicos.....	5
1.1.5. Clínica y diagnóstico .....	9
1.1.6. Tratamiento.....	10
1.1.7. Pronóstico.....	11
1.2. Biología del cáncer de pulmón no microcítico.....	12
1.2.1. Descripción de las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón no microcítico.....	12
1.2.2. Vías biológicas alteradas en cáncer de pulmón no microcítico y dianasterapéuticas.....	20
2. Hipótesis y objetivos.....	29
3. Material y métodos.....	33
3.1. Pacientes.....	33
3.2. Estudio morfológico.....	34
3.3. Técnicas inmunohistoquímicas.....	34
3.4. Estudio genético.....	36
3.4.1. Técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH).....	36
3.4.2. Determinación del estado mutacional de los genes EGFR y PIK3CA.....	37



3.5. Estudio estadístico.....	38
4. Resultados.....	41
4.1. Características clínico-biológicas en la serie de pacientes analizados.....	41
4.2. Incidencia de las alteraciones genéticas detectadas por FISH en carcinoma no microcítico de pulmón.....	44
4.3. Significado de los cambios genéticos detectados mediante FISH en el comportamiento clínico-patológico y genético de la enfermedad.....	49
4.4. Impacto de las características clínico-patológicas y genéticas en la supervivencia libre de enfermedad.....	53
4.5. Impacto de las características clínico-patológicas y genéticas en la supervivencia global.....	60
4.6. Heterogenicidad genética y vías de evolución clonal.....	68
5. Discusión.....	73
5.1. Estudio de las variables clínico-patológicas.....	73
5.2. Estudio de las variables genéticas.....	76
5.2.1. Incidencia de las alteraciones numéricas de cromosómicas en cáncer de pulmón no microcítico.....	76
5.2.2. Diferencias entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso en la frecuencia de alteraciones numéricas de cromosomas.....	79
5.2.3. Heterogenicidad genética y evolución clonal.....	81
5.2.4. Impacto de las alteraciones genéticas en el comportamiento clínico de los pacientes con cáncer no microcítico de pulmón.....	85
6. Conclusiones.....	93
7. Bibliografía.....	97



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cáncer de pulmón

#### 1.1.1. Definición

El cáncer de pulmón es la consecuencia de un crecimiento incontrolado y anormal de las células del pulmón, ocasionando alteraciones funcionales respiratorias por invasión local, o bien en otros órganos por invasión a distancia de ganglios linfáticos, hueso, hígado, cerebro y glándulas suprarrenales entre otros.

#### 1.1.2. Epidemiología

El cáncer de pulmón afecta tanto a hombres como a mujeres, siendo el segundo en frecuencia en varones tras el cáncer de próstata, y el cuarto en mujeres tras el cáncer de mama, colorrectal y cuerpo uterino. En 2012, en España se diagnosticaron 215.534 casos nuevos de cáncer, de los cuales el 12,4% fueron de pulmón. Sin embargo, es el de mayor mortalidad (20,6%), siendo en hombres la principal causa de muerte por cáncer (27,4%) y la segunda en mujeres, detrás del cáncer de mama (9,4%).

Tanto en España, como en el resto de los países occidentales, se alcanzó un pico casi epidémico de tabaquismo a finales del siglo pasado que ha ido descendiendo gracias a las campañas de prevención. Desde entonces la mortalidad en varones ha disminuido, mientras que se ha estabilizado en las mujeres (figura 1).

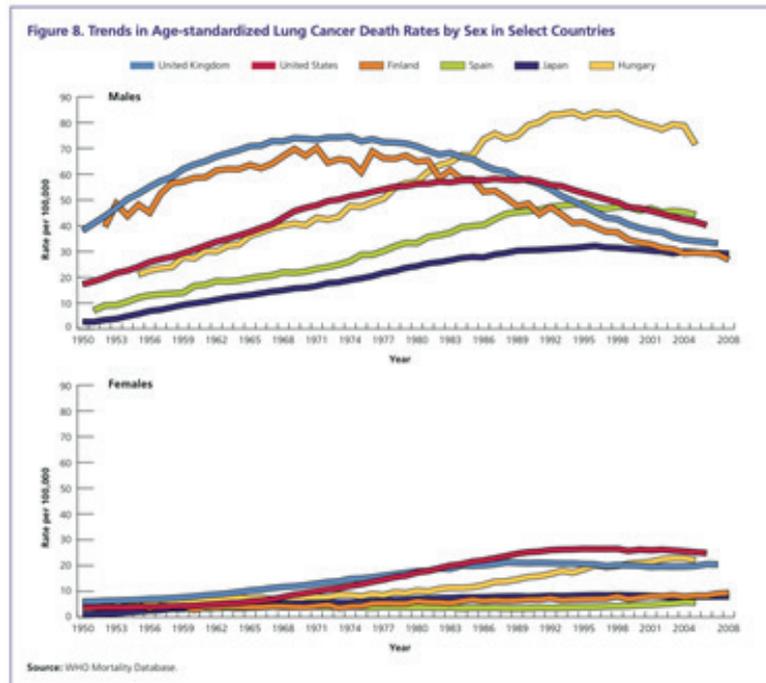


Figura 1.- Tendencias en las tasas de muerte por cáncer de pulmón ajustada por edad en ambos sexos. (Section, 2008)

El cáncer de pulmón sigue siendo uno de los tumores más letales a pesar de los avances acaecidos en las últimas décadas tanto en las técnicas quirúrgicas como en las terapias combinadas. Las tasas de supervivencia relativas a los 5 años en Europa son las segundas más bajas, por detrás del cáncer de páncreas, oscila entre el 7,9% y el 16,5%; siendo en España del 10,7%. Por estadios, cuando la enfermedad está localizada se sitúa en torno al 40-45%, siendo del 30% en los estadios localmente avanzados, y desplomándose en la enfermedad metastásica. No obstante, sólo el 15% de los cánceres de pulmón son diagnosticados cuando la enfermedad está aún localizada (“Globocan 2012 - Home,” n.d.; Instituto De Salud Carlos III, 2004; López-Abente et al., 2008; Profile, Trends, & Incidence, 2014; Section, 2008; Sociedad Española de Oncología Médica, 2014; World Health Organization, 2008; World Health Statistics, 2011).

La edad media al diagnóstico está en torno a los 67 años, siendo excepcional en menores de 45 años. (Hernández-Hernández, Heras-Gómez, Cordovilla-Pérez, Antolín-García, & Bollo De Miguel, 2010; Montero et al., 2003; Santos-Martínez et al., 2005)

### 1.1.3. Factores de riesgo

#### Tabaco

Los primeros estudios epidemiológicos realizados en la década de los años 50 asocian el hábito tabáquico al cáncer de pulmón. A pesar de que el tabaco había sido ampliamente utilizado a lo largo de los siglos, el cáncer de pulmón antes del siglo XX era casi desconocido en la práctica médica (DOLL & HILL, 1954; Shaper, Wannamethee, & Walker, 2003). A raíz de la introducción de los cigarrillos manufacturados con propiedades adictivas, se observó un crecimiento alarmante en el número de casos (Alberg, Ford, & Samet, 2007a). De los más de 5000 componentes del tabaco, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) ha determinado que al menos 76 son carcinógenos, y de estos alrededor de 20 lo son directamente contra el pulmón. De entre ellos, los más potentes son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las N-nitrosaminas y las aminas aromáticas. Todos ellos son metabolizados en un 90% a través el citocromo P450 2A6 (Alberg et al., 2007a), la glutatión-S-transferasa y la UDP-glucuronosil transferasa, que los convierten en sustancias más solubles que puedan ser excretadas. Durante este proceso de detoxificación se producen compuestos que pueden reaccionar con el ADN formando aductos, críticos en el proceso de carcinogénesis. Cuando las proteínas responsables de la reparación del DNA no son capaces de subsanar el daño causado por esos aductos, se producen mutaciones permanentes, que en el caso de afectar a oncogenes o genes supresores de tumores, pueden desencadenar una pérdida de control del ciclo celular y el consiguiente desarrollo de un tumor (Stephen S Hecht, 2012) (figura 2).

Así mismo, existen otros factores asociados al tabaquismo que contribuyen a un daño crónico del epitelio pulmonar y al desarrollo de la neoplasia, como son los co-carcinógenos contenidos en el humo del tabaco (catecoles y fenoles) que potencian notablemente la actividad de los carcinógenos del tabaco (S. S. Hecht, 1999; Stephen S Hecht, 2012).

Otro factor importante es el daño inflamatorio crónico que desencadenan la actividad de mediadores de la inflamación como el NF- $\kappa$ B y el IKB Kinasa  $\beta$ , que desempeñan papeles fundamentales en la promoción tumoral; así como el desarrollo de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Boelens et al., 2011; Stephen S Hecht, 2012).

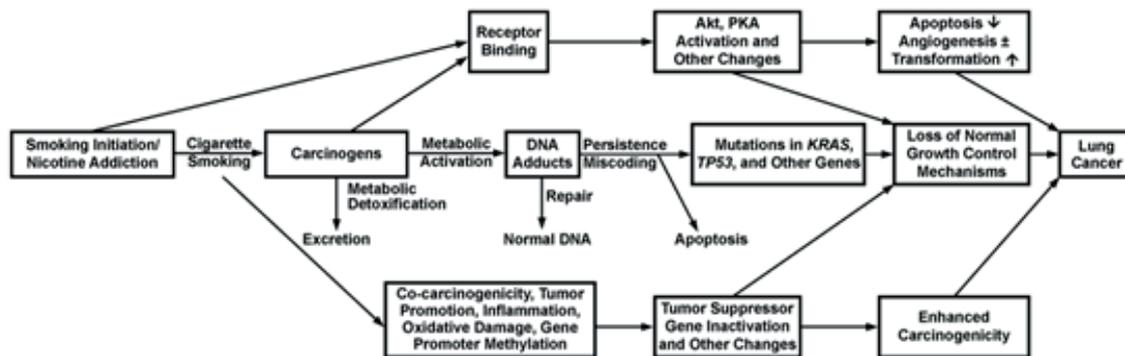


Figura 2.- Secuencia de eventos desencadenados por la acción del tabaco en el epitelio respiratorio en el desarrollo del cáncer de pulmón. (Stephen S Hecht, 2012)

Sin embargo, no todos los fumadores desarrollan cáncer de pulmón, lo que indica que existe una susceptibilidad genética que contribuye al riesgo de padecer esta enfermedad, sobre todo en aquellos en los que aparece a edades tempranas. Estudios de asociación génica han identificado tres regiones cromosómicas relacionadas con un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón. Una de éstas se encuentra ubicada en la región cromosómica 15q25 que codifica ciertas subunidades de receptores nicotínicos acetilcolinesterasa (CHRNA5, CHRNA3 y CHRNB4) y se han relacionado tanto en la dependencia nicotínica como en un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Hung et al., 2008). Además, se ha observado que polimorfismos a nivel de 5p15 se asocian con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón tanto en fumadores como en no fumadores. En este locus se localiza el gen hTERT, que codifica la enzima telomerasa transcriptasa reversa (Zhu et al., 2006). Se ha observado una expresión elevada de la telomerasa en cáncer de pulmón, lo que sugiere un papel crucial en la tumorigénesis, sobretodo de un subtipo histológico concreto, el adenocarcinoma (Truong et al., 2010; Zhu et al., 2006). Por último, la región 6p21 se encontrarían dos genes candidatos para esta susceptibilidad: BAT3, implicado en la apoptosis; y MSH5, relacionado con el sistema “DNA mismatch repair” (Truong et al., 2010; Yufei Wang et al., 2008).

## Otros agentes

A pesar de que el tabaco es la principal causa del cáncer de pulmón, existen otros agentes que actúan al mismo tiempo y/o sinérgicamente con él, y que aumentan el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón.

### **Agentes ocupacionales:**

Exposición a metales como el níquel, cromo y el arsénico; a los gases emanados de los tubos de escape de vehículos diesel; así como, al polvo de silicio.

### **Radón:**

La radiación producida por el radón, gas inerte procedente de la descomposición del uranio, torio y radio.

### **Asbesto:**

Aunque por sí solo es un carcinógeno independiente, tiene un efecto multiplicador en combinación con el tabaco.

### **Polución:**

Es la exposición a los carcinógenos producidos por la combustión de los combustibles fósiles, incluidos los hidrocarburos aromáticos y los metales como el níquel, el cromo y el arsénico. Su concentración es muy variable dependiendo de la localización el momento del día. Hay algunos estudios que cifran en un incremento del 14% el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón por cada 10µg/m<sup>3</sup> de incremento en la concentración de estas partículas en el aire (Alberg, Ford, & Samet, 2007b).

#### **1.1.4. Tipos histológicos**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su libro “Patología y genética de los tumores de pulmón, pleura y timo” en su última edición (Travis, Brambilla, Müller-hermelink, & Travis, W. D., Brambilla, E., Müller-hermelink, H. K., & Harris, C. C. (n.d.). World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification Tumours of the Lung , Pleura , Thymus and Heart Pathology & Genetics Tumours of the Lung , Pleura , Thymu, n.d.), la gran mayoría de los tumores pulmonares son carcinomas.

Los carcinomas pulmonares se dividen en dos grandes grupos, el mayoritario, en torno a un 80% son de célula no pequeña (carcinomas no microcíticos) y los restantes (20%) son de célula pequeña (carcinomas microcíticos). A su vez, los carcinomas no microcíticos se dividen en aquellos que muestran una diferenciación glandular, adenocarcinomas que constituyen el grupo mayoritario; el carcinoma escamoso y el carcinoma indiferenciado de célula grande, el menos frecuente (Figura 3.- composición fotos tipos histológicos). A partir de aquí nos centraremos en el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM).

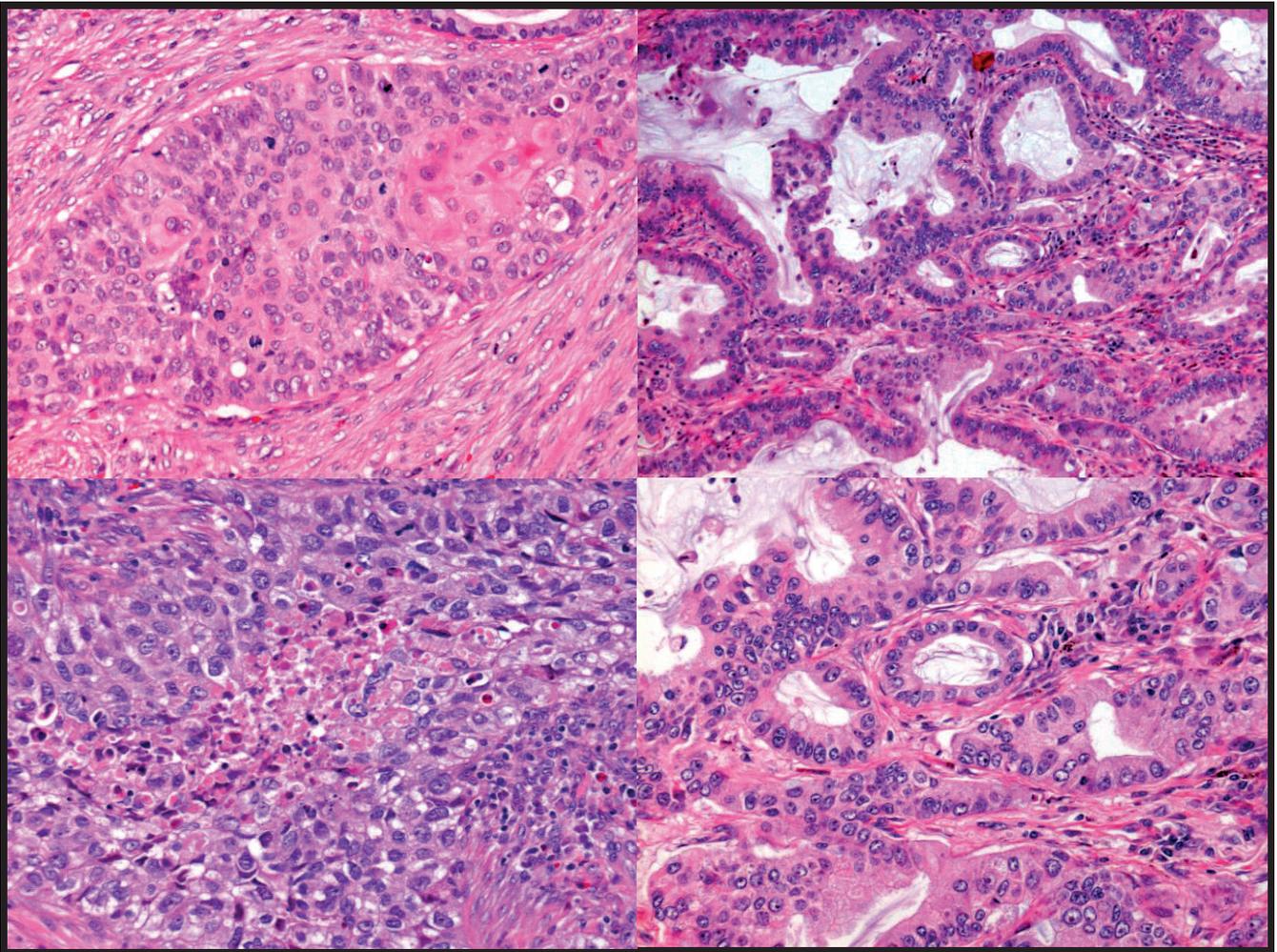


Figura 4.- Imagen histológica de carcinomas escamosos (izquierda) y adenocarcinomas (derecha)

### **Lesiones precursoras**

En el cáncer de pulmón, como en la mayoría de neoplasias, aparece tras una serie secuencial de cambios progresivos moleculares y/o morfológicos en la mucosa respiratoria. Además, se postula que cada una de las lesiones preneoplásicas en el pulmón se asocia a uno o más eventos genéticos. Se propone una vía de carcinogénesis relacionada con el fallo de los sistemas de control de la replicación del

ADN, lo que conduciría a una inestabilidad genómica intrínseca, que a su vez favorecería el acumulo de mutaciones y la transformación neoplásica. En el caso del carcinoma escamoso la secuencia comenzaría por una hiperplasia de células basales, asociada a la pérdida de la región cromosómica 3p, seguida de metaplasia escamosa y la displasia (leve, moderada y severa), con pérdidas en 9p y 2q, como cambios tempranos, y como progresión de la enfermedad, el carcinoma in situ (pérdidas a nivel de 13q y 7p) y el carcinoma microinfiltrante (deleciones en 5q y 18q), (Breuer et al., 2005; Dacic, 2008; Kerr, 2001a) (I I Wistuba, Behrens, Virmani, et al., 1999; I I Wistuba et al., 2000). Además, múltiples estudios han demostrado que la expresión de la proteína p53 está presente en las lesiones bronquiales preinvasivas a diferencia de la mucosa bronquial normal (Brambilla et al., 1998; Rusch, Klimstra, Linkov, & Dmitrovsky, 1995).

En el caso de los adenocarcinomas, las lesiones precursoras empezarían por una hiperplasia adenomatosa atípica en los neumocitos, seguida del adenocarcinoma in situ, no mucinoso o mucinoso. Dado que las alteraciones de EGFR y KRAS son mutaciones “drivers” se encuentran con frecuencia en este tipo de lesiones preneoplásicas de forma mutuamente excluyente (Gazdar & Brambilla, 2012). Así mismo, el acortamiento telomérico es otro de los eventos iniciales claves en la génesis de este subtipo histológico (Kawai, Hiroi, Nakanishi, & Meeker, 2007; Travis, Brambilla, Noguchi, Nicholson, Geisinger, Yatabe, Ishikawa, Wistuba, Flieder, Franklin, Gazdar, Hasleton, Henderson, Kerr, Nakatani, et al., 2013; Tsuta et al., 2013).

### **Carcinoma infiltrante**

El concepto de compartimentos pulmonares propuesto por Gazdar y Brambilla (Gazdar & Brambilla, 2012) es esencial para entender el pulmón y sus tumores. El pulmón es uno de los pocos órganos donde se organizan distintos compartimentos anatómicos y funcionales, y que por tanto dan lugar a diferentes tipos tumorales. De tal modo que tendríamos un compartimento central constituido por bronquios de gran a mediano calibre, dedicados a la conducción aérea. Estarían tapizados por un epitelio pseudoestratificado con células neuroendocrinas, células ciliadas altas luminales y células mucosecretoras. La célula madre transformada de la vía aérea central sería la responsable del carcinoma de células escamosas y del adenocarcinoma central. Del mismo modo, existiría un compartimento periférico constituido por bronquiolos y alveolos. Los bronquiolos estarían recubiertos por una monocapa de células ciliadas y células Clara. Y los neumocitos tipo I que permiten el intercambio gaseoso

y los tipo II, que secretan surfactante conformarían el epitelio alveolar. La célula madre transformada de la vía aérea periférica daría lugar a los adenocarcinomas periféricos.

A raíz del artículo de consenso publicado en 2011 por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón, la Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Respiratoria Europea (Travis et al., 2011; Travis, Brambilla, Noguchi, Nicholson, Geisinger, Yatabe, Ishikawa, Wistuba, Flieder, Franklin, Gazdar, Hasleton, Henderson, Kerr, Nakatani, et al., 2013; Travis, Brambilla, Noguchi, Nicholson, Geisinger, Yatabe, Ishikawa, Wistuba, Flieder, Franklin, Gazdar, Hasleton, Henderson, Kerr, Petersen, et al., 2013) se ha producido un cambio en la comprensión del adenocarcinoma pulmonar. Los avances realizados en los años precedentes a este artículo llevan a una aproximación diagnóstica multidisciplinar de este tipo de tumores. Introduce una nueva clasificación (Figura 4), elimina términos confusos como el “bronquioloalveolar”, establece criterios claros para el diagnóstico de las lesiones preinvasivas, sugiere pautas de manejo en las biopsias pequeñas y citologías e introduce en el diagnóstico rutinario la determinación de alteraciones moleculares con implicaciones terapéuticas. Así mismo, asocia subtipos histológicos con alteraciones moleculares concretas.

Table 1. IASLC/ATS/ERS <sup>a</sup> Classification of Lung Adenocarcinoma in Resection Specimens
Preinvasive lesions
Atypical adenomatous hyperplasia
Adenocarcinoma in situ (≤3 cm, formerly BAC)
- Nonmucinous
- Mucinous
- Mixed mucinous/nonmucinous
Minimally invasive adenocarcinoma (≤3 cm lepidic-predominant tumor with ≤5 mm invasion)
- Nonmucinous
- Mucinous
- Mixed mucinous/nonmucinous
Invasive adenocarcinoma
Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with >5 mm invasion)
Acinar predominant
Papillary predominant
Micropapillary predominant
Solid predominant with mucin production
Variants of invasive adenocarcinoma
Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
Colloid
Fetal (low and high grade)
Enteric

Abbreviation: BAC, bronchioloalveolar carcinoma.  
<sup>a</sup> International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society.

Figura 4.- Propuesta de clasificación de los adenocarcinomas de pulmón (Travis, Brambilla, Noguchi, Nicholson, Geisinger, Yatabe, Ishikawa, Wistuba, Flieder, Franklin, Gazdar, Hasleton, Henderson, Kerr, Nakatani, et al., 2013)

Del mismo modo que lo ocurrido con el adenocarcinoma, las nuevas tinciones inmunohistoquímicas

y los avances en la rutina del diagnóstico molecular, han permitido reducir la frecuencia del diagnóstico del carcinoma indiferenciado de célula grande hasta el 1,1% (Project & Network Genomic Medicine, 2013); que se había convertido en un cajón de sastre en el diagnóstico basado exclusivamente en la hematoxilina-eosina (Rossi et al., 2014).

Todos estos cambios han sido incorporados a la nueva clasificación de tumores pulmonares de la OMS publicada en 2015 (Figura 5).



Figura 5 .- Clasificación histológica de los tumores de pulmón (Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, 2015)

### 1.1.5. Clínica y diagnóstico

Lamentablemente el cáncer de pulmón no suele cursar con ningún síntoma hasta que la enfermedad ya está extendida, y aún cuando aparecen estos pueden ser enmascarados por procesos no tumorales, lo que retrasa aún más el diagnóstico. En este sentido, los diagnósticos en etapas tempranas suelen ser fortuitos, por pruebas de imagen por otras enfermedades. Los síntomas más comunes son una tos

persistente, neumonía o bronquitis que no mejora, tos con esputos sanguinolentos, pérdida de peso o apetito, cansancio o debilidad, dolor en el pecho que empeora al inspirar profundamente, al toser o reír, y ronquera. Los síndromes paraneoplásicos no son infrecuentes (hipercalcemia, exceso de ACTH) y se asocian principalmente al carcinoma epidermoide y microcítico. Por último, si la masa tumoral se localiza en la parte superior del pulmón derecho pueden ocasionar un síndrome de vena cava superior (“cancer.org,” n.d.; Travis et al., n.d.).

Tras una evaluación inicial (historia clínica y examen físico), es necesario realizar pruebas de imagen. Se utiliza la tomografía computarizada (TC) para evaluar la extensión del tumor primario. Normalmente el escáner tomográfico por emisión de positrones (PET) se reserva para aquellos pacientes con tumores susceptibles de ser resecados en los que se quiera descartar una afectación ganglionar. Si se sospechan metástasis deben realizarse una gammagrafía ósea, un TC abdominal y/o una (RM) (resonancia magnética), dependiendo de la sintomatología del enfermo.

Tras los datos iniciales obtenidos por el “National Lung Screening Trial” (ACRIN Protocol A6654), sociedades científicas, entre ellas la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) recomiendan realizar un cribado (TC de baja dosis) sobre pacientes de alto riesgo, fumadores o exfumadores de menos de 15 años entre los 55 y los 74 años sin datos de cáncer de pulmón (Clinical, Guidelines, & Guidelines, 2015). No obstante, para el diagnóstico definitivo se requiere una confirmación histológica, mediante citología (esputo, lavados bronquioloalveolares, punción aspiración guiada por TC o transbronquial, derrame pleural, ... etc) o biopsia transbronquial.

### **1.1.6. Tratamiento**

El tratamiento del cáncer de pulmón depende del estadio clínico que se encuentre en el momento de su diagnóstico. En estadios iniciales sin ganglios metastásicos en las pruebas radiológicas, la primera opción es cirugía. Dependiendo del estado de los ganglios tras el estudio patológico, recibirán o no quimioterapia adyuvante. Los pacientes en estadios iniciales pero con tumores no resecables o ganglios metastásicos preoperatorios reciben además radioterapia. En estadios más avanzados se valora la administración de quimio y radioterapia neoadyuvante con el fin de disminuir el tamaño del tumor, y dependiendo de la respuesta al tratamiento, se decide un segundo pase o la extirpación quirúrgica del

tumor. Para estadios avanzados (con afectación ganglionar o metastásicos) el tratamiento de elección es la quimioterapia o la quimio-radioterapia, dependiendo de los órganos afectados (Clinical et al., 2015).

El tratamiento quimioterápico estándar actual está basado en dobles de platino (cisplatino, carboplatino)(NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016; Pfister et al., 2004). Sin embargo, la introducción de los nuevos fármacos que actúan sobre moléculas diana como EGFR, ALK o ROS-1 que se encuentran alterados en la variante adenocarcinoma, ha supuesto una revolución en los tratamientos de la enfermedad avanzada (Desai, Menon, & Dy, 2016; Ge & Shi, 2015; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016).

### **1.1.7. Pronóstico**

El cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en el mundo (Ferlay et al., 2013; Jemal et al.). La tasa de supervivencia a los 5 años es muy variable entre los diferentes estadios, oscilando entre el 50-70% del estadio I, 40-55% para el estadio II, entre el 7-25% en el estadio III y del 2 al 13% del estadio IV(NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016). Un número bajo de pacientes continúa siendo diagnosticado en estadios iniciales, donde la cirugía es una opción terapéutica excelente (Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016; Scott, Howington, Feigenberg, Movsas, & Pisters, 2007); aun así, las tasas de recurrencia en algunas series alcanzan el 50% de los pacientes operados con intención curativa(Nakagawa et al., 2008; Song et al., 2014; Uramoto & Tanaka, 2014). Aunque la quimioterapia adyuvante está indicada para los pacientes con enfermedad metastásica o localmente avanzada, está indicado su uso adyuvante en pacientes quirúrgicos a partir del estadio IIA(NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016); no obstante, el beneficio absoluto que aporta a la supervivencia sigue siendo bajo (4,1%) (CITA 58). Por todo ello, el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón, a pesar de todos los esfuerzos en investigación, sigue siendo fatal.

Algunos de los factores que más influyen en el pronóstico son la edad avanzada, el sexo masculino, la presencia de comorbilidades cardiovasculares, los valores de función pulmonar < 50%, los valores SUVmax en el PET-TC ( $\geq 9$ ), la afectación de los ganglios linfáticos, el estadio TNM mayor y la desdiferenciación del tumor, que se asocian con una supervivencia más corta (Guerrera et al., 2015)

(Riquet et al., 2014) Sin embargo, la mutación de EGFR

## **1.2. Biología del cáncer de pulmón no microcítico**

### **1.2.1 Descripción de las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es una neoplasia muy compleja desde el punto de vista biológico e histopatológico. Al igual que otras neoplasias epiteliales es la consecuencia de múltiples etapas dentro de un proceso de carcinogénesis. Como resultado, esta sucesión de eventos a nivel molecular, implican una pérdida del control sobre el ciclo celular y/o la diferenciación, así como el desarrollo de mecanismos que eviten la apoptosis y que generen nuevas interacciones con el microambiente que rodea a la célula tumoral. Las alteraciones genéticas juegan un papel fundamental en cada uno de los pasos de esta secuencia. La identificación de éstas es esencial para comprender el proceso neoplásico y poder desarrollar así dianas terapéuticas encaminadas a frenarlo. Prueba de esta importancia es la gran cantidad de estudios publicados en los últimos años. Para tratar de comprender estos eventos genéticos, inicialmente, se utilizaron técnicas de citogenética convencional. Sin embargo, los resultados eran muy pobres, debido en parte a que el número de pacientes o líneas celulares estudiadas era pequeña (30 en la serie más extensa), también a la dificultad de obtener metafases y, sobre todo, a la difícil interpretación de cariotipos tan complejos (Berker-Karaüzüm et al., 1998; Erdel, Peter, Spiess, Trefz, & Ebert, 1990; van der Riet-Fox, Retief, & van Niekerk, 1979; Whang-Peng et al., 1982).

Actualmente, la mayoría de los trabajos publicados utilizan técnicas de citogenética modernas como las de alta densidad. De entre éstas, la más extendida son los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH). En su conjunto, las técnicas de alta densidad han demostrado que existen un gran número de alteraciones en los dos subtipos principales de CPNM. Las alteraciones numéricas más frecuentes son las ganancias frente a las pérdidas (Staaf et al., 2013; Yakut et al., 2006). Las anomalías cromosómicas más frecuentes en CPNM varían de unos autores a otros. No obstante, una revisión exhaustiva de la literatura revela que las regiones más alteradas en CP son +1q, +2p, -3p, +3q, -4q, +5p, -5q, -7p, -7q, -8p, +8q, -9p, +11q, -13q, +14q, +16p, -17p, +17q y +20q (Baik et al., 2009; Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; J. U. Kang, Koo, Kwon, Park, & Kim, 2008; Kerr, 2001b; Pei et al., 2001; Project & Network Genomic Medicine, 2013; Shen, Gao, Wu, Qiu, & Shu, 2009; Staaf et al., 2013; Sy et al., 2004;

Tai et al., 2004; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Yakut et al., 2006). Esta gran variabilidad afecta no solo a las regiones cromosómicas descritas si no también a la frecuencia de cada uno de los eventos, por ejemplo la delección de 5q oscila entre un 8% y un 68% dependiendo de las series revisadas (Boelens et al., 2009; Danner et al., 2011). En algunos casos los datos pueden ser contradictorios, algunos autores hablan de ganancias de 14q (6-20%) o de 16p (20-46%) (J. S. Choi et al., 2006; Weir et al., 2007; Yakut et al., 2006), mientras que otros reflejan pérdidas de 14q (21-53%) y de 16p (6-35%) (J. S. Choi et al., 2006; J. U. Kang et al., 2008; Takamochi et al., 2001; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006).

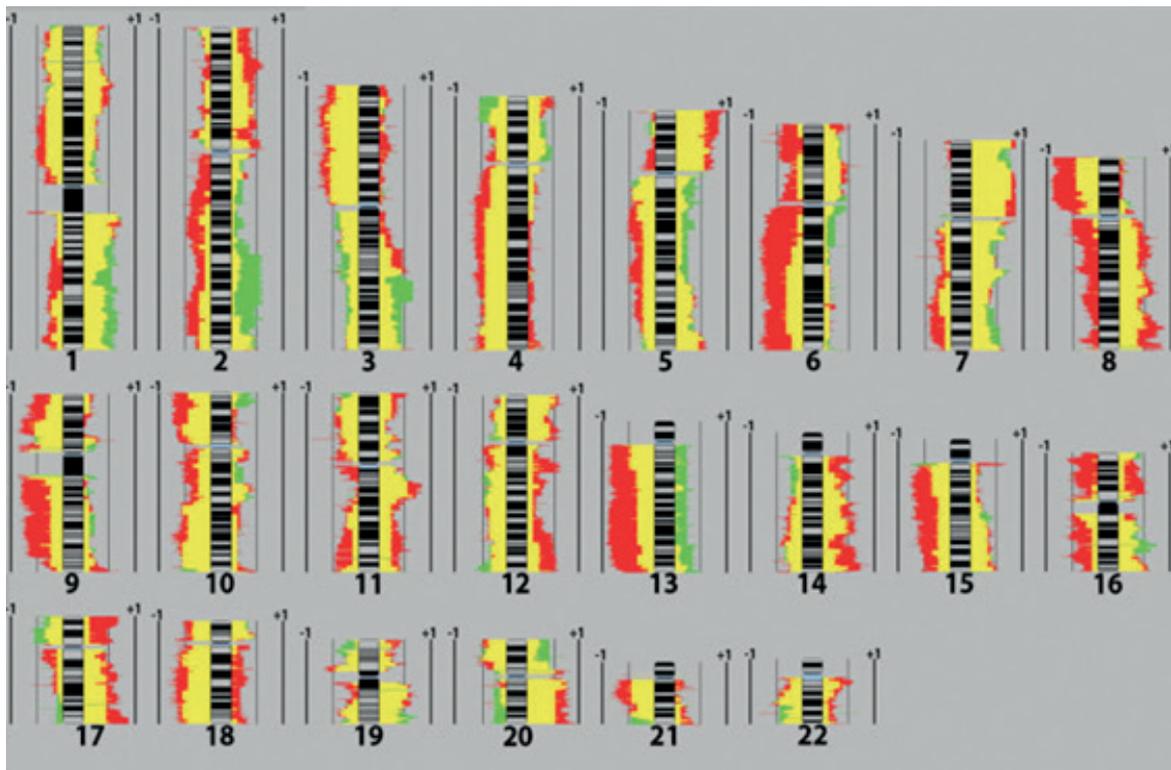


Figura 7.- Comparación de las anomalías genéticas en el carcinoma escamoso versus adenocarcinoma de pulmón. El color amarillo representa las regiones más frecuentemente alteradas en ambos subtipos histológicos, mientras que en rojo y verde se aprecian las anomalías más habituales en adenocarcinomas y carcinomas escamosos, respectivamente (Garnis et al., 2006b).

La co-ocurrencia específica de algunas de las alteraciones halladas en los diferentes subtipos del cáncer de pulmón sugieren que puede ser posible el determinar patrones de alteraciones que puedan usarse para identificar las distintas histologías basados únicamente en la genómica (The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013). Sin embargo, pocas de las alteraciones genéticas halladas en estos trabajos son claramente discriminatorias de una u otra

histología. Entre los dos subtipos histológicos principales existe una mayor pérdida de heterocigosidad en los CE frente a los ADC (Staaf et al., 2013). Existe cierta controversia entre las alteraciones cromosómicas capaces de discriminar entre ADC y CE, mientras que está ampliamente aceptado la relación entre la ganancia de 3q y CE, y la pérdida 3p, 4p, 4q, 5p en ADC (Mccaughan et al., 2010; Sriram et al., 2012; Staaf et al., 2013). El resto de los autores aportan distintas alteraciones, por ejemplo Yakut et al describen +3q y +18p en CE y +5p y 14q en ADC (Yakut et al., 2006), Shen et al describen +16p13 y -17p12-p13 en ADC; y +3q24-q26 y -3p24-p25 en CE (Shen, Zhu, Wu, Qiu, & Shu, 2008). Otros como Garnis et al hablan de que las pérdidas de 2q y 13q se dan en adenocarcinomas, mientras que en escamosos se ganan (Garnis et al., 2006a). Tai et al describe que las diferencias más significativas se encuentran en la ganancia de 3q en CE y la ganancia de 20q y pérdida de 9p en adenocarcinomas (Tai et al., 2004). Las amplificaciones recurrentes también varían dependiendo de la histología. Las amplificaciones de 3q24-q29, 8p12 (FGFR1/WHSC1L1) y 11q13.2-q13.3 (CCND1) son más frecuentes en tumores escamosos; mientras que la amplificación en 14q13.3 (NKX2-1) es la más prevalente en adenocarcinomas (Staaf et al., 2013; The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013), para otros investigadores la amplificación de 16p13 (TSC2) es la más frecuente en ADC, mientras que la de 17p21 (KRT10, 13, 14, 15, 16, 19, 20 y KRT23, genes de citoqueratinas) lo es en escamosos (Shen et al., 2009).

Las series relativamente cortas, la mezcla descompensada de subtipos histológicos, así como de estadios diferentes pueden justificar en parte esta variabilidad. Por último y más importante, la mayoría de los trabajos publicados no tienen en cuenta la presencia de perfiles genéticos complejos, que son el reflejo de la heterogeneidad de este tipo de neoplasias, y por tanto aplican técnicas que no permiten identificar las alteraciones cromosómicas de las poblaciones celulares menos representadas en cada muestra tumoral. Por este mismo motivo, en nuestro estudio nos hemos decantado por la técnica de FISH (Hibridación In Situ Fluorescente). Aunque no permite hacer un estudio global del genoma, nos posibilita hacer el estudio simultáneo de varias regiones del genoma, de forma fácil, reproducible, sensible y específica; y además, teniendo referencias morfológicas. Por tanto, de este modo obtenemos la información de todos los clones celulares contenidos en una muestra de cáncer de pulmón independientemente de su cuantía, lo cual es más acorde con la naturaleza heterogénea de estos tumores.

Ante esta avalancha de datos, es importante diferenciar entre mutaciones esenciales para la aparición y/o el mantenimiento del estado neoplásico (“drivers”), y las mutaciones secundarias (“passenger”) que no tendrían tanta importancia para el fenotipo maligno (Futreal, 2007; Stratton, Campbell, & Futreal, 2009). Las mutaciones esenciales o primarias aparecerían en el curso de las distintas etapas de la carcinogénesis, y se mantendrían durante la progresión tumoral, de tal manera que células con pocas alteraciones esenciales estarían al comienzo de ese proceso. Según avanzara esa secuencia, se irían acumulando nuevas mutaciones esenciales relacionadas con la adquisición de capacidades vitales para la célula tumoral, sobre todo proliferación y supervivencia. De este modo, los tumores dependerían de la expresión de estos oncogenes para la supervivencia, demostrando debilidades que podrían ser atacadas por dianas terapéuticas. Las mutaciones secundarias serían debidas a la inestabilidad genómica, y podrían aparecer en cualquier momento de la evolución tumoral, la invasión o la metástasis (Gazdar & Brambilla, 2012; Pao & Girard, 2011)

### **Alteraciones genéticas primarias**

Esta ampliamente aceptado que un evento temprano en la evolución del CPNM, así como la pérdida cromosómica más frecuente en estos tumores, es la delección del brazo corto del cromosoma 3 (Garnis et al., 2006a; Kerr, 2001b). Wistuba et al. publicaron a finales de los noventa varios artículos que demostraban la pérdida de múltiples alelos en 3p y que esta pérdida precedía al cambio reconocible histológicamente en el epitelio bronquial de pacientes con cáncer de pulmón. También observaron que estas alteraciones eran mayores al incrementar la severidad de la lesión histológica (de normal a displásica, y de ahí a carcinoma in situ) (I. Park et al., 1999; I I Wistuba et al., 2000; Ignacio I Wistuba et al., 1999).. Estos resultados sugieren la presencia de genes supresores de tumores en esta localización que estarían involucrados en los primeros estadios de la enfermedad. La región más frecuentemente delecionada en muestras preneoplásicas o no neoplásicas asociadas al CPNM es 3p21 (Ignacio I Wistuba et al., 1997), donde se localizan genes relacionados con la reparación del DNA como son hMLH1 y hMSH2, aunque la mayoría de las alteraciones asociadas a estos genes se relacionan con procesos de hipermetilación del promotor (Antczak et al., 2013; Vageli et al., 2009; Y.-C. Wang et al., 2003).

FHIT, 3p14.2, se localiza en la región FRA3B. FHIT (“fragile histidine triad”) está inactivado en una alta proporción de cánceres (entre un 20-100% dependiendo de los tipos tumorales) y lesiones premalignas, incluido el cáncer de pulmón, donde su inactivación es casi dos veces más frecuente en

pacientes fumadores que en no fumadores, lo que nos indica su alta sensibilidad a carcinógenos. La función de FHIT es solo parcialmente conocida, contribuye a la regulación de la expresión de genes esenciales para la proliferación y la supervivencia como CCND1 y BIRC5, e interviene en la inducción de la apoptosis mediante distintas vías como SRC y AKT1, y en la mediada por p53/TP53 a través de su actuación sobre MDM2 (Nishizaki et al., 2004; Weiske, Albring, & Huber, 2007). Su pérdida tiene severas consecuencias en el control normal del ciclo celular (Cecener et al., 2008; Pekarsky, Zanesi, Palamarchuk, Huebner, & Croce, 2002; Sozzi et al., 1996; Ignacio I Wistuba et al., 1997)..

En la bibliografía, la pérdida del brazo corto del cromosoma 9 se describe como otra anomalía genética considerada temprana dentro de la transformación maligna. Más concretamente 9p21, donde se localiza CDKN2 o p16, un gen supresor de tumores (Kerr, 2001b; Ignacio I Wistuba et al., 1997). Su pérdida se ha descrito tanto en el epitelio respiratorio de pacientes fumadores como en > 70% de las líneas celulares obtenidas a partir de CPNM humanos, y por tanto, demuestra su implicación en los primeros pasos de la carcinogénesis. Aunque mucho menos frecuente, también se ha descrito la hipermetilación del promotor como otro mecanismo de inactivación de p16 (Belinsky et al., 2002) tanto en epitelio bronquial de pacientes fumadores como en hiperplasias focales de neumocitos tipo II (H. Nakanishi et al., 2009). Varella-García et al. la han relacionado con un peor pronóstico en estadios quirúrgicos así como con recurrencia en estadio I (Marileila Varella-Garcia, 2010).

Las mutaciones en el gen supresor de tumores p53 son comunes a la mayoría de los tumores. En CPNM muchos autores han descrito la pérdida de heterocigosidad de 17p21 asociada al cambio displásico del epitelio (L. Mao et al., 1997; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Ignacio I Wistuba et al., 1997). La incidencia de su delección es mayor en carcinoma escamoso, y su pérdida estaría más relacionada con lesiones preinvasivas de mayor grado, displasias de alto grado y carcinoma in situ (Kerr, 2001b; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Ignacio I Wistuba et al., 1999). En adenocarcinomas, su mutación se asocia al paso de HAA a adenocarcinoma invasivo(Dacic, 2008). Del mismo modo, la alteración en 13q14, RB, otro gen supresor de tumores se produciría en este punto de la evolución tumoral, no tan inicial como la pérdida de 3p o 9p, pero sí asociado a casi todos los carcinomas in situ, sobre todo en la variante escamosa (Dacic, 2008; Kerr, 2001b; Ignacio I Wistuba et al., 1997), aunque otros autores como Wistuba et al. lo asocian a la invasión (I I Wistuba, Behrens, Milchgrub, et al., 1999).

La subunidad catalítica de la transcriptasa reversa telomerasa humana (hTERT), localizada en 5p15.33 que restaura la longitud de los telómeros en las células tumorales, es esencial para la proliferación tumoral, convirtiéndolas en inmortales tras la inactivación de genes supresores como p53 (Lantuejoul et al., 2005). Se ha descrito la amplificación de hTERT en múltiples cánceres, entre ellos el CPNM (A. Zhang et al., 2000). Algunos autores como Nakanishi et al. han observado altos niveles de hTERT mRNA en la hiperplasia alveolar atípica (HAA) y en el adenocarcinoma in situ (K. Nakanishi et al., 2002). Otros como Lantuejoul et al. los han detectado en la metaplasia escamosa y, focalmente, en el carcinoma in situ próximo a las zonas de invasión.

Varios autores han estudiado las mutaciones de EGFR y KRAS en lesiones preinvasivas de adenocarcinomas, descubriendo que ambas mutaciones están presentes en la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA), y que, por tanto ambos son eventos tempranos en la evolución. Sin embargo, la mutación de KRAS se encuentra en un porcentaje desproporcionado con respecto a la de EGFR en la HAA (40% frente a 15% respectivamente) y sobre todo con respecto a los adenocarcinomas invasivos, donde la mutación de KRAS está en un 10-15% mientras que la de EGFR es de hasta 35%, lo cual sugiere que la lesiones HAA que portan la mutación de KRAS progresan hacia un cáncer invasivo con menor frecuencia (Dacic, 2008; Sakamoto et al., 2007; Soh, Toyooka, Ichihara, & Asano, 2008; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Yatabe, Takahashi, & Mitsudomi, 2008; Yoshida et al., 2005; Yoshizawa et al., 2011).

Una de las alteraciones más constantes y que mayores diferencias muestra entre subtipos histológicos es la amplificación de la porción distal de 3q, más concretamente de 3q26-q29, en carcinomas escamosos. Algunos autores lo identifican como el cambio al fenotipo maligno, mientras que otros lo hacen con el carcinoma invasivo únicamente (Foster et al., 2005; Massion et al., 2003; Mccaughan et al., 2010). Se han identificado numerosos genes en esta localización como PIK3CA, EIF4G, EVI1, FXR1, THPO, TERC, RAP2B, CLDN1, SOX2 and TBL1XR1 and TP73L. De entre estos, posibles candidatos a oncogenes podrían ser PIK3CA en 3q26.3 que es un componente clave en varias vías de transmisión de señales intracelulares o TP73L (p63) en 3q28, homólogo de p53, regula la proliferación y diferenciación celular (Qian & Massion, 2008). Varios autores han observado que la amplificación de esta región se mantiene a lo largo de la evolución del tumor y la enfermedad metastásica. De hecho, se ha relacionado la amplificación de SOX2 (3q26.33) con la formación de metástasis y la protección antia-apoptótica en carcinomas escamosos de pulmón (Mantripragada & Khurshid, 2013).

Diversos autores han descrito deleciones del brazo largo del cromosoma 5 en CPNM en lesiones no precursoras del cáncer de pulmón (Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006). Mendes-da-Silva (Mendes-da-Silva, Moreira, Duro-da-Costa, Matias, & Monteiro, 2000) mapeó el cromosoma 5 en busca de posibles genes candidatos a supresores de tumores, y encontró cinco segmentos frecuentemente delecionados: 5q11-q13 donde se localiza el gen hMSH3, relacionado con la reparación del DNA. 5q15, una localización próxima al gen APC, y que se ha descrito asociada al cáncer de ovario. 5q22.3-q23.1, que incluye los loci de APC y MCC. Aunque las mutaciones de  $\beta$ -catenina y APC no son frecuentes, Stewart et al. han descrito distintas alteraciones de la vía Wnt en CPNM asociadas a estadios avanzados y mal pronóstico (Stewart, 2014). Las deleciones en 5q31.1 se han descrito asociadas al síndrome mielodisplásico, el cáncer de esófago y el cáncer gástrico. En esta región se localiza el gen supresor de tumores IRF-1 (Factor Regulador del Interferon 1). Por último, 5q35.3, en la región frágil FRA5G, que algunos autores como Nymark et al. lo han relacionado con el desarrollo de neoplasias pulmonares tras la exposición al asbesto, lo que indica que podría existir en esta región un gen supresor de tumores sensible a la acción de determinados carcinógenos (Nymark et al., 2006).

### **Alteraciones genéticas secundarias**

De entre las múltiples alteraciones genéticas descritas en la bibliografía (figura 11), destaca la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 7 y 8q. Ambas alteraciones se han asociado con la progresión tumoral. Las ganancias del cromosoma 7 se han relacionado con un comportamiento más agresivo y estadios más avanzados (Boelens et al., 2009; Danner et al., 2011; Pei et al., 2001; Sriram et al., 2012). En el cromosoma 7 se localizan EGFR (7p11.2) y MET (7q21-31), principales oncogenes identificados, que se encuentran mutados y/o amplificados en muchos de los CPNM. Sin embargo, algunos autores como Garnis et al. han observado alteraciones recurrentes, ganancias, en el cromosoma 7 que no estarían en relación con los loci de EGFR y MET, indicando así la presencia de otros posibles oncogenes (Garnis et al., 2006a). Por ejemplo, en 7q36 se localiza SHH que se encuentra sobreexpresado en numerosas neoplasias, y se relaciona con una peor supervivencia (Boelens et al., 2009; W. G. Jiang et al., 2015). En el brazo corto de este cromosoma se han identificado otros candidatos que serían CARD11, ETV1, IKZF1, HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXA11 and HOXA13 y CALM1P1 (Ji Kang, 2013; J. Wang et al., 2015).

Las ganancias de C-MYC (8q24) se han asociado a un mayor grado histológico, estadios más evolucionados y peor pronóstico en CPNM. Más concretamente, en adenocarcinomas, se ha relacionado su sobreexpresión en estadios tempranos con un mayor riesgo de evolución de la enfermedad y muerte (Danner et al., 2011; Pei et al., 2001; Seo et al., 2014; The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013).

De entre el resto de alteraciones secundarias menos frecuentemente descritas destacan las asociadas a la recurrencia de la enfermedad, la enfermedad metastásica y la mala evolución de la enfermedad. La ganancia de 1q (ARG), la pérdida de 18q (SOCS6) y la inactivación de LKB1 (19p13, STK11) se han descrito asociadas a la recidiva tumoral (Sriram et al., 2012; Tai et al., 2004; Yakut et al., 2006; Zhao et al., 2014). Sung et al han relacionado la pérdida de heterocigosidad de 11p, donde se localiza, entre otros CDKNK1C, con la recaída temprana en los adenocarcinomas (Sung, Park, & Kim, 2010). La extensión de la enfermedad a los ganglios linfáticos se ha relacionado con la ganancia de 5q y 7q (Pei et al., 2001) y en carcinomas epidermoides, con la amplificación de 7p (T. Jiang, Gao, Fan, Li, & Zhou, 2015). El desarrollo de enfermedad metastásica se ha asociado a la ganancia de 11p (Danner et al., 2011) y la inactivación de STK11 (19p13.3) con las metástasis (M Sanchez-Cespedes, 2007; Montserrat Sanchez-Cespedes et al., 2002; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Zhao et al., 2014). De entre los hallazgos asociados a mal pronóstico destacarían, las dobles mutaciones de EGFR/p53 y RB1/p53 (The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013); y las amplificaciones de c-myc, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad (Iwakawa et al., 2011; Marileila Varella-Garcia, 2010).

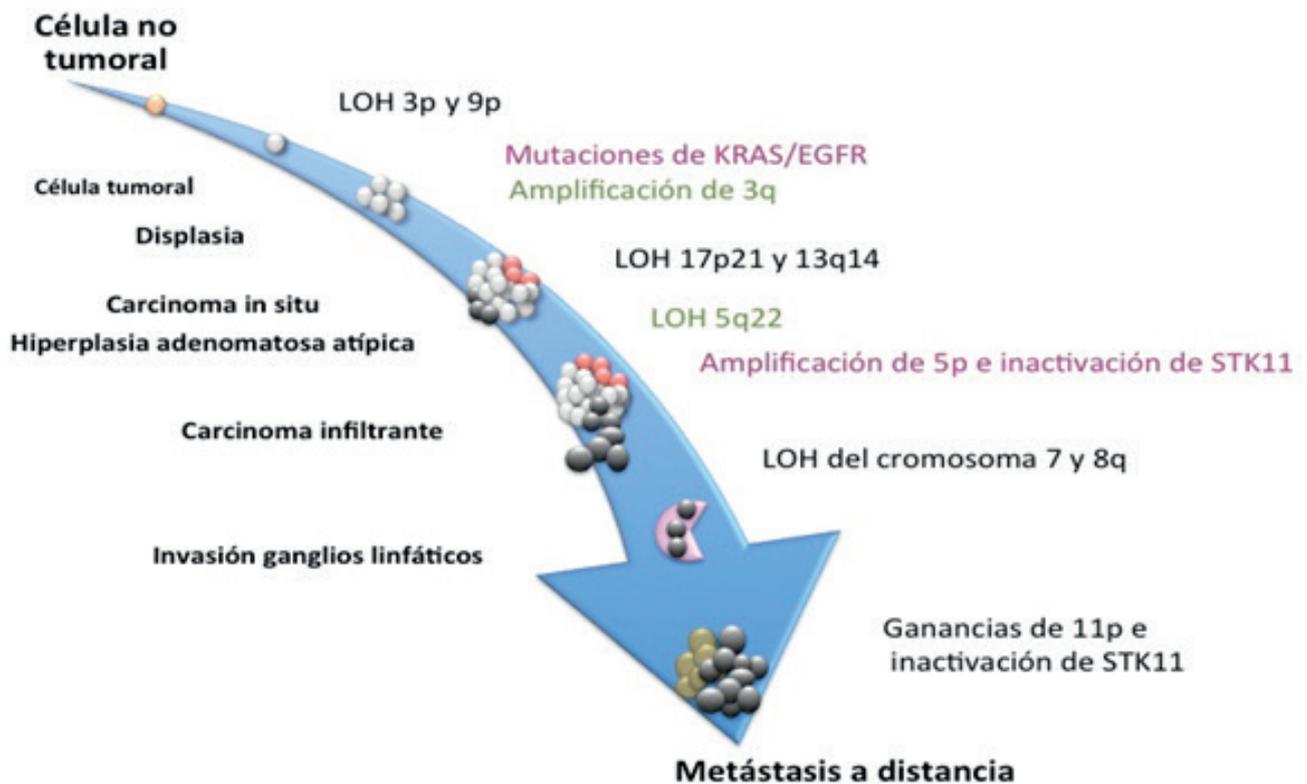


Figura 8.- Modelo hipotético de los cambios genéticos asociados a la transformación neoplásica y la progresión maligna que ocurriría en los CPNM en base a la literatura revisada. En color negro se muestran las alteraciones comunes a ambas histologías, las que están en color verde se han descrito en carcinoma escamoso y en rosa, las relacionadas con los adenocarcinomas.

### 1.2.2 Vías biológicas alteradas en CPNM y dianas terapéuticas.

Como se ha comentado anteriormente, el cáncer de pulmón no microcítico se ha dividido clásicamente en dos grandes subtipos histológicos y clínicos; sin embargo, esta división es más compleja a nivel molecular. Este tipo de neoplasia presenta altas tasas mutaciones somáticas, reordenamientos inter e intracromosómicos y alteraciones en el número de copias de algunos genes en comparación con otros tipos tumorales, que hacen muy difícil su estudio. Muchas de estas alteraciones afectan genes que intervienen en varias rutas moleculares, complicando la interpretación de sus alteraciones. Por el contrario, las mutaciones en algunos genes son excluyentes entre sí, lo que sugiere que son funcionalmente equivalentes, y la mutación de uno de ellos es suficiente para el mantenimiento de la vía. Las mutaciones secundarias que se producen a lo largo de una misma ruta son el fundamento de las resistencias terapéuticas, inicialmente efectivas (Conde et al., 2006; Lynch et al., 2004). El Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM) ha publicado

en los últimos años varios artículos para tratar de caracterizar a nivel molecular el cáncer de pulmón y los subtipos histológicos principales. Según estos artículos, en adenocarcinomas las alteraciones más frecuentemente encontradas son las amplificaciones de 5p, 7p (EGFR), 8q (c-myc), 11q (CCND1), 12q (MDM2), 14 (NKX2-1) y 17q (ERBB2); las mutaciones de BRAF, KRAS, EGFR, ERBB2 y STK11/LKB1; y la traslocación de ALK. En los carcinomas epidermoides estarían las amplificaciones de 1p (MYCL1), 3q (SOX2), 7p (EGFR), 8p (FGFR1) y 11q (CCND1); y las mutaciones de DDR2, FGFR3 y NFE2L2.

Aunque existen algunas alteraciones encontradas con mayor frecuencia en uno u otro, es complicado separarlos a nivel molecular (figura 9). No obstante, el estudio de dichas alteraciones, y sobre todo, su incorporación a los algoritmos manejo de esta patología es fundamental en para el tratamiento y el pronóstico de los pacientes.

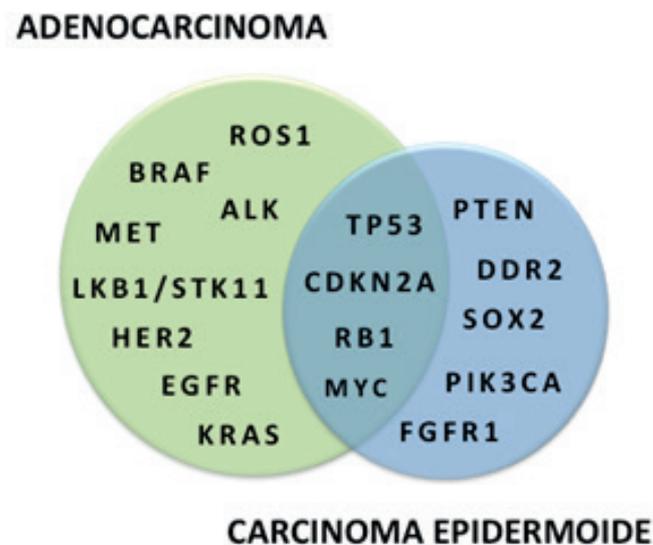


Figura 9.- Esquema de las alteraciones más frecuentes en adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón.

## EGFR

Los receptores TK (RTK) son proteínas transmembrana que tienen en común el poseer un dominio tirosin-kinasa intracelular similar. Están divididos en distintas familias que presentan pequeños cambios en su estructura que los diferencian. Permiten la comunicación de la célula con el medio que la rodea. Mediante su unión a distintos ligandos extracelulares específicos, trasducen la señal hacia el interior de la célula, ocasionando la activación del metabolismo celular, la proliferación, la motilidad... etc. Cuando estos receptores están alterados pueden funcionar como oncoproteínas. De entre los RTK destaca la

familia HER/ERBB que junto con sus ligandos permite el crecimiento y la proliferación de la célula. Dentro de ellos, los dos más importantes son el Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 1 (EGFR, ErbB1) y HER2 (HER2/neu, ErbB2). Todos estos receptores pueden estar afectados por mutaciones puntuales o pequeñas deleciones.

El descubrimiento de las mutaciones de EGFR ha supuesto el mayor cambio en el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón de los últimos años. Está presente entre un 10 a un 16% de los pacientes con CPNM avanzado subtipo adenocarcinoma. Es más frecuente en mujeres (69,7%) y en pacientes que nunca han fumado (66,6%). Las mutaciones de EGFR varían con los subtipos histológicos (figura 10). La alteración genética más frecuente es la deleción en el exón 19 alrededor de los codones 746- 750 (62,2%), seguida de mutaciones puntuales en el exón 21, la más frecuente L858R (38,5%) (Rosell et al., 2009). Ambas mutaciones son las que mejor responden a la terapia. Otras mutaciones menos frecuentes son L816Q, G719X y S768I, que se consideran sensibilizadoras. Por último, se ha visto que la mutación inserción/deleción del exón 20, (5-10%) no es sensible a los tratamientos anti-EGFR. Los pacientes con mutación de EGFR tienen un mayor tiempo libre de progresión y una mayor supervivencia global (Q. Zhang et al., 2014).

Actualmente existen tres tratamientos disponibles, dos fármacos de primera generación (gefitinib y erlotinib) con tasas de respuesta del 60-70% y con una supervivencia libre de progresión en torno a los 9-10 meses (Asahina et al., 2006; Inoue et al., 2006; Sequist et al., 2008). Más recientemente se han desarrollado nuevos fármacos anti-EGFR (afatinib), que al contrario que los de primera generación, se unen de forma irreversible al RTK-EGFR. Afatinib ha demostrado mejores tasas de respuesta, mayor supervivencia libre de progresión y mejor calidad de vida en varios ensayos clínicos randomizados de fase II (Kerr et al., 2014). A pesar de lo efectiva de la respuesta inicial a los tratamientos anti-EGFR, tras 10-15 meses los pacientes desarrollan resistencia adquirida. Para tratar de evitar este mecanismo de escape de la célula tumoral al tratamiento se está desarrollando una tercera generación de inhibidores EGFR (T. Li, Kung, Mack, & Gandara, 2013; Morgensztern et al., 2015).

## **HER2 Y HER3**

Son miembros de la familia HER/ERBB de RTK, a pesar de que la vía intracelular de activación es

común, varían en su habilidad para unir el ligando (que es baja para HER2) y en su dominio TK (HER3 no tiene actividad TK y requiere de la heterodimerización para activar las señales intracelulares). El heterodímero que ocasiona la señal más potente es la unión de HER2 y HER3.

Las mutaciones en el dominio TK de HER2 en CPNM se describieron por primera vez en 2004 (Stephens et al., 2004) y están presentes en el 2-4% de los casos, aunque en aquellos pacientes sin mutación de EGFR, el porcentaje asciende al 14%. Las alteraciones en la vía de HER2 llevan a la activación constitutiva de la vía, dando como resultado la supervivencia y el crecimiento celular. A pesar de que no se han descrito mutaciones en el gen HER3, se ha vinculado a la falta de respuesta a los tratamientos que inhiben EGFR y HER2 (Sergina et al., 2007).

## **ALK**

El gen ALK codifica para un RTK que se identificó por primera vez como parte de la traslocación t(2;5) asociado al linfoma anaplásico. En cáncer de pulmón, la alteración genética es el reordenamiento cromosómico, la más frecuente es la inversión pericéntrica del brazo corto del cromosoma 2, inv(2)(2p21p23), lo cual crea un gen de fusión codificado por el extremo aminoterminal de EML4 (2p21) y la región intracelular de ALK (2p23) (Lindeman et al., 2013). Existen otras variantes de fusión menos frecuentes, que incluyen traslocaciones con otros cromosomas (Rikova et al., 2007; Takeuchi et al., 2009).

Los reordenamientos de ALK están presentes en un 3 a un 7% de los casos de CNMP, pero pueden llegar hasta el 13-17% en pacientes seleccionados mediante características clínico-patológicas, especialmente en jóvenes, no fumadores e histología de adenocarcinoma (N. N. Zhang et al., 2014). Los genes de fusión resultantes funcionan como conductores oncogénicos potentes, y llevan a la célula a un estado de adición oncogénica, que significa que la supervivencia de la célula puede verse comprometida por la inactivación de un único oncogen (Weinstein & Joe, 2008).

En los últimos años se han desarrollado fármacos que inhiben ALK, en Europa está únicamente aprobado Crizotinib, que además, tiene actividad frente a otras alteraciones como MET y ROS1. Ha demostrado beneficios significativos en cuanto a supervivencia libre de progresión y a calidad de vida.

(Felip et al., 2015; Morgensztern et al., 2015).

## **ROS1 y RET**

Los genes de fusión son el resultado de deleciones cromosómicas o reordenamientos intra o extracromosómicos, en los que se unen partes de dos genes diferentes. El resultado de esta reorganización de material genético es la formación de transcritos de RNA mensajero y proteínas quiméricas. ROS1, RET y NTRK-1 (Receptor TK Neurotrófico, tipo 1) se forman por la fusión del extremo 3' de genes que codifican para RTK con la región 5' de otro gen. Ese otro gen generalmente provee de promotores que permiten la transcripción, a través de la fosforilación de RAS, activan las vías MAPK y Akt que promueven la proliferación celular. Se desconoce si los diferentes compañeros de fusión generan otras proteínas de fusión con diferentes actividades, entre ellas la variación de la sensibilidad al tratamiento (Aisner et al., 2013; Alrifai et al., 2013; Davies & Doebele, 2013; Warth et al., 2014; J.-J. Yang et al., 2014).

ROS1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 6, y está implicado en la progresión tumoral. Se encuentra en el aproximadamente el 2% de los pacientes con CPNM, más frecuentemente en pacientes no fumadores y jóvenes. Así mismo, es más frecuente en adenocarcinomas, subtipos sólido y papilar (Go et al., 2013), aunque la histología no es el criterio de selección, pues se ha descrito en otras histologías, como la escamosa (Morgensztern et al., 2015).

RET se encuentra en el cromosoma 10. Tiene una incidencia de entre 1,4 y 2% de los CPNM, se observa más frecuentemente en adenocarcinomas, y pacientes jóvenes no fumadores (Felip et al., 2015). Aunque la alteración en CPNM más frecuente es la traslocación, se han descrito también ganancias y amplificaciones (H.-S. Yang & Horten, 2014).

## **MET**

MET es un oncogen localizado en 7q31, que codifica para un RTK (HGFR) que tiene como ligando el factor de crecimiento hepatocitario (HGF). La unión receptor-ligando provoca la dimerización del receptor y la fosforilación del dominio TK intracelular (Ponzetto et al., 1994). Esto desencadena la activación de varias rutas intracelulares (PI3K/Akt y Ras-Raf-MAPK) que están relacionadas con

funciones fundamentales para la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación, la regulación del citoesqueleto y la angiogénesis (Furge, Zhang, & Vande Woude, 2000). Puede existir activación independiente de ligando, que es debida a las interferencias con otros RTK, sobre todo con los de la familia EGFR/ERBB (Maroun & Rowlands, 2014).

MET está presente en un alto número de tumoraciones sólidas, sin embargo los porcentajes en CPNM son muy variables, oscilando del 1% al 61%; sin embargo, en lo que todos los artículos coinciden es que es un factor de mal pronóstico, sobre todo en histología escamosa (Felip et al., 2015; Go et al., 2010; Ma et al., 2005; S. Park et al., 2012). Además, MET se ha identificado como un mecanismo de resistencia muy importante en el tratamiento anti-EGFR, se cree que hasta un 20% de las resistencias observadas son debidas a amplificaciones de MET (Felip et al., 2015; Go et al., 2010; Morgensztern et al., 2015).

## **BRAF**

Es un oncogen que codifica para una kinasa Ser-Thr que con actividad GTPasa que activa vías de proliferación. Pertenece a la familia de las proteínas RAS kinasa. Las mutaciones de BRAF se identificaron originalmente en melanomas. En CPNM supone un 1-3%, las mutaciones de BRAF son más frecuentes en adenocarcinomas y en relación al tabaquismo, aunque también se han descrito en carcinoma epidermoide (Morgensztern et al., 2015).

## **KRAS**

Se localiza en 12p12.1 y es miembro principal de la familia de proteínas RAS (que incluyen HRAS y NRAS). En el caso del CPNM, las dos mutaciones más frecuentes son G12C (40%) y G12V (20%) (Karachaliou et al., 2013; Shepherd et al., 2013; Slebos et al., 1991). Se estima que las mutaciones de KRAS se encuentran en el 30% de las neoplasias; y en alrededor del 20-30% de los CPNM, especialmente en adenocarcinomas y pacientes fumadores (Ding et al., 2008; Nelson, Wymer, & Clements, 1996). Rara vez se han descrito asociadas a histología escamosa, y se estima que solo el 2-6% de los pacientes no fumadores tienen mutaciones de KRAS (C. Mao et al., 2010; Suzuki, Orita, Shiraishi, Hayashi, & Sekiya, 1990). Son mutuamente excluyentes con las alteraciones de EGFR, ALK y ROS1. Su papel pronóstico no

es claro, hay estudios que lo asocian con un peor pronóstico en términos de supervivencia (Mascaux et al., 2005), mientras que otros no encuentran diferencias (Shepherd et al., 2013). Actualmente no existen tratamientos disponibles frente a KRAS en el contexto del CPNM.

## **PIK3CA**

La principal subunidad catalítica de la familia de las proteínas PI3K es la isoforma p110 $\alpha$ , que está codificada por PIK3CA (3p16) (Samuels et al., 2004). Como ya se ha desarrollado antes, la principal vía de funcionamiento es Akt/mTOR que regula el crecimiento, la supervivencia celular y la motilidad (Mantripragada & Khurshid, 2013). Así mismo, la activación de PI3K induce la regulación positiva de varios factores de transcripción como MYC, JUN, JUN-B, FOS, HMGA1 y HES1; que son nodos principales de múltiples rutas moleculares (Scrima et al., 2012).

Se han descrito mutaciones somáticas de PI3K en múltiples tumores. En CPNM su frecuencia es inferior al 5%, siendo mayor en el carcinoma escamoso (6,5%) frente al adenocarcinoma (1,5%). En el carcinoma escamoso se ha observado que además de las mutaciones puntuales, la amplificación juega un papel importante, sobre todo en pacientes varones y fumadores (Mantripragada & Khurshid, 2013; Morgensztern et al., 2015; Pao & Girard, 2011). Las mutaciones más frecuentes en CPNM afectan a los residuos de Glu542 y Glu545, en el exón 9 (Pao & Girard, 2011). Las mutaciones de PIK3CA pueden coexistir con mutaciones de EGFR, KRAS, NRAS y BRAF. Además, la activación de la vía PIK3/Akt promueve la resistencia al tratamiento anti-EGFR en cánceres de pulmón con mutación de EGFR (5%) (Mantripragada & Khurshid, 2013).

## **FGFR**

La familia FGF/FGFR está formada por 18 ligandos (FGF) que se unen a 4 RTK homólogos (FGFR 1-4). La unión del ligando con el receptor lleva a la dimerización, y la consiguiente activación de la TK, que a su vez activa las vías de señalización intracelular, entre las que se encuentran PI3K/Akt y Ras-Raf-MAPK (Morgensztern et al., 2015). La desregulación de este receptor se ha descrito en un gran número de tumores, incluido el cáncer de pulmón (Mason, 2007; Turner & Grose, 2010). Las alteraciones genéticas descritas son la amplificación, la traslocación y las mutaciones puntuales. Su amplificación

se ha detectado hasta en un 20% de los tumores escamosos de pulmón, y rara vez en adenocarcinomas (3%) (Dutt et al., 2011).

### **LKB1 / STK11**

La Kinasa Hepática B1 (LKB1) o también conocida como Kinasa Serina-Treonina 11 (STK11) se encuentra frecuentemente mutada en CPNM. LKB1 se considera un gen supresor de tumores localizado en 19p13.2. LKB1 se describió por primera vez en el Síndrome de Peutz-Jerghers (Hemminki et al., 1998). Su pérdida es una de las alteraciones más frecuentes en CPNM (30%) (Montserrat Sanchez-Céspedes et al., 2002), encontrándose en un 34% de los adenocarcinomas y en un 19% de los carcinomas epidermoides (Ji et al., 2007). Es más frecuente en pacientes fumadores, varones y portadores de mutaciones en KRAS (Matsumoto et al., 2007). De hecho, algunos artículos estudian el posible efecto sinérgico entre KRAS y LKB1, sobre todo en el momento de metastatizar (Ji et al., 2007; Zhao et al., 2014). Es una barrera fundamental en la tumorigénesis pulmonar, pues interviene tanto en la iniciación como en la metástasis (Ji et al., 2007; Matsumoto et al., 2007).

### **Inhibidores del control inmune: PDL1 y CTLA4**

El sistema inmune tiene un papel crítico en la identificación y destrucción de células extrañas o anormales en el organismo, así como supresores del crecimiento tumoral (Swann & Smyth, 2007). Los tumores son capaces de evitar esta actividad promoviendo las señales negativas de control de células T. Existen numerosas moléculas co-inhibidoras, que incluyen el antígeno 4 asociado a linfocitos T (CTLA4), proteína 1 de muerte celular programada (PDL1) y sus ligandos PD-L1 y PD-L2, gen-3 de activación linfocitaria (LAG-3), mucina-3 de la inmunoglobulina de la célula T (TIM-3) (Aerts & Hegmans, 2013; Nirschl & Drake, 2013; Pardoll, 2012). La inhibición del bloqueo que ocasiona el tumor mediante estas sustancias permite restaurar la respuesta de las células T frente al tumor, añadiendo otra opción terapéutica en el armamento frente al CPNM (Langer, 2014; Morgensztern et al., 2015).



# 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2.1 Hipótesis

Los adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón suponen casi el 80% de todos los casos diagnosticados de cáncer de pulmón. Al igual que otras neoplasias, constituyen una enfermedad en la que el material genético se ve afectado. En ello influyen dos vías principales: la inestabilidad genética y la inestabilidad cromosómica. Ambas, de forma progresiva, conducen a una alteración en las vías de control de la proliferación y diferenciación celular. En este sentido, se han propuesto vías de carcinogénesis relacionadas con este fallo en los sistemas de control de la replicación celular que ocasionaría inestabilidad genómica intrínseca, que a su vez permitiría el acúmulo de mutaciones y la alteración generalizada de todo el genoma.

La mayoría de los carcinomas de pulmón no microcítico (CPNM) muestran algún tipo de alteración citogenética, desconociéndose la incidencia exacta de muchas de ellas y sus implicaciones clínicas y evolutivas. Dada la gran heterogeneidad genética del CPNM, la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) permitiría estudiar las alteraciones genéticas en cada célula individualmente, identificando así pequeños clones tumorales que con técnicas de alta densidad, como los arrays de CGH (aCGH) y de SNPs (Single nucleotide polymorphisms), no podríamos detectar. Además, un número creciente de estudios indica que el comportamiento clínico y biológico de una neoplasia depende en gran medida de las alteraciones genéticas subyacentes y de las interacciones entre las células tumorales y el micromedioambiente que las rodea, traducidas a su vez en distintos perfiles de alteración genética y de expresión génica, que para el CPNM, siguen sin conocerse en profundidad, especialmente en lo que se refiere a las distintas vías de evolución clonal existentes a nivel intratumoral.

Por otra parte, hoy sabemos que el comportamiento de las células tumorales del CPNM (y de otros tumores) no solo depende de las alteraciones que afectan a genes que codifican para proteínas, sino que distintas vías de evolución clonal existentes a nivel intratumoral. La utilización de técnicas que permiten el análisis de las alteraciones cromosómicas a nivel de células individuales, en combinación con su perfil de expresión a nivel inmunohistoquímico, nos permitirá profundizar en el conocimiento de

la heterogeneidad genética y de las vías de evolución clonal existentes, tanto a nivel intratumoral en cada paciente, como a nivel intertumoral entre distintos pacientes con CPNM, proporcionando así información clave para determinar el impacto de las distintas alteraciones genéticas en el comportamiento biológico, histopatológico, clínico y pronóstico del CPNM.

## 2.2. Objetivos

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos hemos planteado como objetivo general profundizar en el conocimiento de las alteraciones genéticas y genómicas del CPNM, con especial énfasis en las vías de evolución clonal presentes a nivel intratumoral, y su impacto en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo de la enfermedad. Para ello hemos delineado cuatro objetivos específicos:

1. Analizar en un grupo reducido de pacientes con CPNM (n=20) de acuerdo a los subtipos histológicos, adenocarcinoma (n=10) y carcinoma escamoso de pulmón (n=10):

- La incidencia de alteraciones cromosómicas mediante FISH y PCR.

- Identificar las posibles correlaciones entre las alteraciones detectadas en cada región genética y los datos clínico-patológicos y evolutivos de estos tumores, con especial hincapié en la identificación de aquellas anomalías génicas asociadas a una mayor supervivencia.

- Determinar cuáles son las vías de evolución clonal intratumoral, debidas a la inestabilidad cromosómica que con mayor frecuencia se observan en adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón.

2. Seleccionar aquellas alteraciones genéticas que han mostrado una significación estadística con la histología o con las características clínicas y evolutivas de los pacientes para analizarlas en una serie más amplia de pacientes con CPNM (n=101).

3. Determinar la incidencia de las alteraciones cromosómicas mediante FISH en los dos principales tipos histológicos del CPNM.

4. Determinar las regiones cromosómicas con valor pronóstico en cuanto a la supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE).



# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

## 3.1. Pacientes

En el presente estudio se ha realizado un análisis inicial con 20 pacientes diagnosticados y tratados entre 2009 y 2010 en el Servicio de Cirugía Torácica del Complejo Asistencial de Salamanca. La mitad de los pacientes fueron diagnosticados de carcinoma epidermoide de pulmón (n=10) tras la cirugía; y la otra mitad de adenocarcinoma primario pulmonar (n=10). Los resultados obtenidos fueron validados en 82 pacientes (39 pacientes con carcinoma escamoso y 43 casos de adenocarcinomas) operados y diagnosticados entre 1993 y 2004 en el Servicio de Cirugía Torácica del Complejo Asistencial de Salamanca. En todos los casos el diagnóstico se estableció según los criterios convencionales de la Organización Mundial de la Salud (Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, 2015), complementado con técnicas de inmunohistoquímica en los casos con diagnóstico dudoso (figura 10) y se estratificaron de acuerdo al sistema TNM del “American Joint Committee on Cancer” (UICC/AJCC) 7ª edición 2010).

La recogida de los datos para la obtención de las variables epidemiológicas, clínicas y patológicas correspondientes al estadio patológico de la enfermedad, el tipo de cirugía, el estado de los márgenes quirúrgicos, el establecimiento de tratamiento adyuvante y los datos de seguimiento (supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y evolución) se llevó a cabo mediante la revisión de las historias clínicas de toda la serie tras la realización de la intervención quirúrgica.

De los 101 pacientes analizados, 86 (85%) fueron hombres y 15 (15%) mujeres, con edades comprendidas entre 35 y 86 años ( $66 \pm 10$  años). El 74% de los pacientes eran fumadores activos o exfumadores desde hace  $\leq 2$  años mientras que el 5% de pacientes padecían una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), estos dos antecedentes coincidían en 39 pacientes (38%). En el momento de este estudio el 78% de los pacientes habían fallecido. La supervivencia global (SG) es de  $62 \pm 66$  meses con una media de seguimiento de  $54 \pm 63$  meses. Según la clasificación americana TNM, la mayoría de los pacientes se encontraban en un estadio clínico localizado (59% pacientes en estadio I, 23% pacientes en estadio II y 18% en estadio III). Tan solo un paciente presentó un estadio avanzado

(estadio IV), en el momento del diagnóstico.

### **3.2. Estudio morfológico**

Para llevar a cabo tanto los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) como los genéticos diseñamos tres tissue microarrays (figura 11), uno con los primeros 20 casos diagnosticados de carcinoma epidermoide (n=10) y adenocarcinoma primario pulmonar (n=10), otro con 38 pacientes con carcinoma escamoso y un tercero con las muestras correspondientes a los 43 pacientes restantes con diagnóstico de adenocarcinoma. Así mismo, en todos ellos incluimos tejidos de control. Cabe destacar que todas las muestras fueron incluidas por triplicado (Kononen et al., 1998; Sanchez-Carbayo, 2011).

Para seleccionar las muestras se utilizaron las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina donde se marcaron las zonas más representativas de cada tumor. Después se compararon las zonas marcadas de las preparaciones con sus correspondientes bloques de parafina (bloques donantes). Se prepararon los bloques donantes, con un mínimo aconsejado de 2 mm de profundidad tisular y con una adecuada preservación antigénica durante el proceso de fijación. Seleccionamos la zona elegida en el bloque de parafina. Confeccionamos una plantilla, identificando todos los cilindros y su disposición en la matriz tisular. En un bloque de parafina en blanco, de 40x25 mm, utilizado como receptor de las muestras titulares, se introdujeron los cilindros seleccionados con agujas de 0,6mm, ajustando la profundidad de descenso de las agujas aproximadamente a 3mm. Una vez terminado, incubamos el bloque en una estufa a 50°C durante 10 minutos, aproximadamente, permitiendo que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los orificios del array del bloque receptor. Se sacaron los bloques de la estufa y se presionaron sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie. Se realizaron cortes de 3-4 micras, se pasaron por parafina líquida con el fin de almacenar los diferentes cortes realizados. A partir de aquí se procesaron los cortes histológicos como cualquier corte de tejido.

### **3.3. Técnicas de inmunohistoquímica**

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron en varios cortes obtenidos de las matrices de tejido. La inclusión de los anticuerpos y los reactivos se realizó de manera automática mediante el procesador BOND-III de Leica. A continuación se detalla el protocolo de actuación:

- Se realizaron cortes de 3-5 micras mediante micrótomo Leitz (Germany) de las muestras incluidas en la matriz.

- Se incubaron en estufa a 60°C durante 24 horas.

- El procesamiento automático se realizó en mediante el procesador BOND-III (A. Menarini Diagnostics, San Diego, USA) mientras que el proceso de tratamiento e incubación de los anticuerpos se realizó con el Bond Polymer Refine Detection (Leica Microsystems (UK) Ltd, Milton Keynes UK ), que consta de un bloqueante de peroxidasa, un post-primario, un polímero y una diaminobecidina. Los anticuerpos primarios estudiados fueron:

Ki67, mib1 (Vitro) con una dilución 1/100.

p53 (Leica), 1/1000.

TTF1 (Leica) Prediluido

p40 (Menarini) 1/200

p16 (Roche) Prediluido

- En todos los casos las incubaciones fueron a 60°C a 10". Una vez terminado el proceso las muestras fueron deshidratadas y se montaron con medio permanente "DEXPEX" (Merck).

La expresión de TTF1, p40 y p16 se consideró positiva cuando teñía el núcleo en más de un 15% de las células tumorales analizadas, mientras que la de Ki67(mib1) y p53 se consideró positiva cuando estaba presente en más de un 5 y un 10% respectivamente (figura 10).

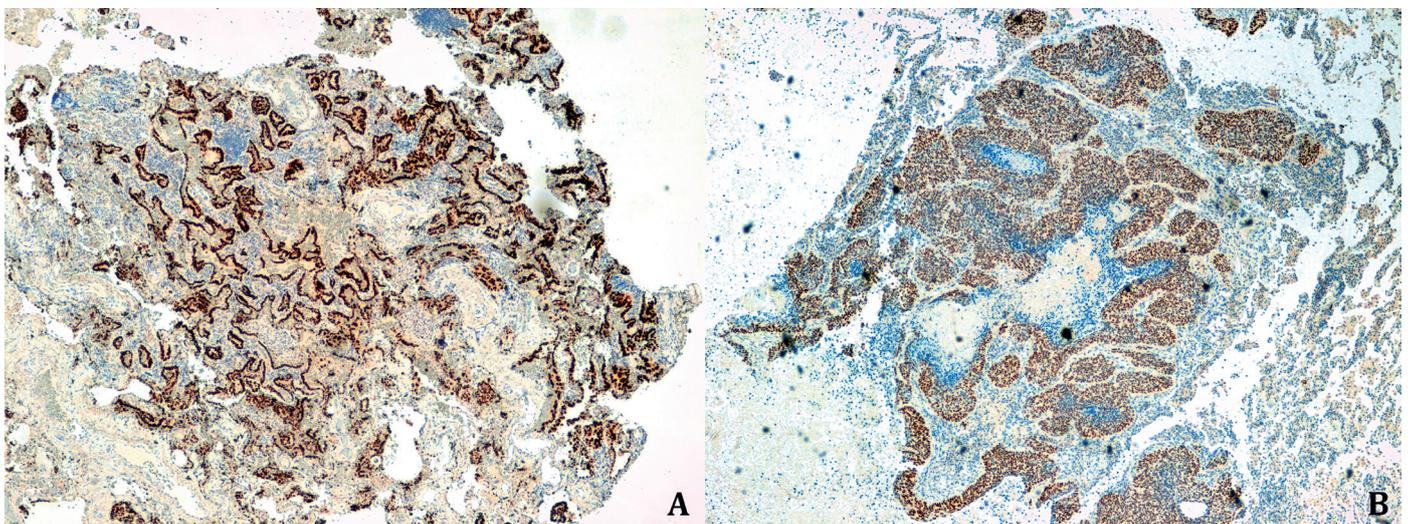


Figura 10. Imagen histológica de la inmunotinción con TTF1 (A) y p40 (B).

### 3.4. Estudios genéticos

#### Técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH)

Para la detección de alteraciones cromosómicas empleamos técnicas de FISH con marcajes dobles y triples (spectrum aqua, green y orange), con sondas centroméricas y específicas de locus para las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en cáncer de pulmón, 5p, 5q, 7p, 8p, 8q, 9p, 10q, 13q, 14q, 17p, 17q, 18q, 22q y X (Baik et al., 2009; Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; J. U. Kang et al., 2008; Kerr, 2001b; Pei et al., 2001; Project & Network Genomic Medicine, 2013; Shen et al., 2009; Staaf et al., 2013; Sy et al., 2004; Tai et al., 2004; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Yakut et al., 2006), sobre las matrices tisulares parafinadas.

Para los estudios de FISH de los pacientes antes mencionados hemos partido de muestras tumorales y normales obtenidas al diagnóstico e incluidas en parafina, el análisis de FISH se llevó a cabo sobre núcleos interfásicos. Para llevar a cabo dicho análisis hemos empleado 20 sondas diferentes de la casa comercial Vysis Inc; Downers, Grove, IL: 1) la sonda LSI Cri-du-Chat Dual Color [LSI EGR1 (5q31)/D5S721, D523] para el estudio del cromosoma 5; esta sonda presenta ADN complementario de la región 5q31, que contiene el locus EGR1, marcado en rojo y ADN que hibrida con la región 5p15.2 marcado en fluorescencia verde; 2) la sonda LSI® EGFR (7p12) SpectrumOrange/ CEP® 7 SpectrumGreen™ Probe para el estudio del cromosoma 7, que contiene secuencias complementarias del gen EGFR marcada en fluorescencia roja y de la región centromérica 7p11 marcado en verde; 3) la sonda ProVysion™ Multi-color Probe para el estudio del cromosoma 8, constituida por, ADN complementario del gen LPL, localizado a nivel de 8p22 marcado en rojo, ADN complementario del gen c-myc (8q24) marcado en verde y ADN que hibrida el centrómero del cromosoma 8 (8p11.1) marcado en aqua; 4) la sonda LSI® p16 (9p21) SpectrumOrange/CEP® 9 SpectrumGreen™ Probe para el estudio del cromosoma 9, esta constituida por ADN complementario del gen p16 (9p21) marcado en rojo y ADN que hibrida en la región centromérica 9p11.1 marcado en verde; 5) la sonda LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe para el estudio del cromosoma 10, formada por ADN complementario del gen PTEN (10q23) marcado en rojo y ADN que hibrida en la región centromérica 10p11.1 marcado en verde; 6) la sonda LSI® 13 (RB1) SpectrumOrange™ para el estudio del cromosoma 13 contiene secuencias de ADN específicas del gen RB1 marcada en fluorescencia roja; 7) la sonda LSI® IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe para el estudio de los cromosomas 14 y 18, constituida por una mezcla de sondas dirigidas para

la detección del gen BCL2 (18q21) en fluorescencia roja y del gen IgH (14q32) en fluorescencia verde; 8) LSI® 22 (BCR) SpectrumGreen™ para el estudio del cromosoma 22, marcada directamente en fluorescencia verde y complementaria del gen BCR (22q11.2). Para el estudio de alteraciones numéricas de los cromosomas 17, 18 y X, hemos utilizado sondas que contienen secuencias cromosoma-específicas de ADN satélite altamente repetido, localizado en la región centromérica del cromosoma, marcadas en fluorescencia aqua. Para el estudio de reordenamientos ALK (2p23) y ROS1 (6q22.1) y amplificación del gen MET (7q31) se utilizaron las sondas de la casa comercial DAKO.

Los portas previamente desparafinados se incubaron de forma secuencial con soluciones que contenían 0.1 mg/ml de pepsina (10 minutos a 37°C), formaldehído al 1% (10 minutos a temperatura ambiente) y finalmente se deshidrataron con etanol con técnicas previamente establecidas. A continuación, se realizó una desnaturalización del ADN celular y de la sonda a 75°C (1 minuto ); posteriormente los portas se incubaron en un termociclador (Hybrite™) toda la noche a 37°C. El revelado de la señal se realizó a 46°C con una solución de 50% formamida en 2xSSC seguido de un lavado en PBS-tween. La contratinción de las células se llevo a cabo con 4'6' diamino -2-fenilindol (DAPI).

El número de señales de hibridación/célula se cuantificó utilizando un microscopio de fluorescencia (Leiz Werzler, Germany) equipado con un objetivo de inmersión de 100x; se realizó un contaje de al menos 200 células por muestra.

Los criterios de evaluación para detectar las diferentes alteraciones numéricas en los distintos genes se definieron por la pérdida, ganancia o amplificación de las correspondientes señales de fluorescencia en más del 15% de los núcleos. Se definió la ganancia cuando el ratio de señales del gen específico frente a señales del centrómero fueron  $\geq 1.2$ . Cuando el ratio de señales del gen específico fue con respecto al centrómero fue  $\leq 0.8$  se consideró delección. La amplificación se consideró cuando el ratio de señales del gen específico frente al centrómero fue  $\geq 2$  (Lopez-Beltran et al., 2010; M Varella-Garcia et al., 2009).

### **Determinación del estado mutacional de los genes EGFR, KRAS y PIK3CA**

Las mutaciones en el gen EGFR fueron identificadas a través de la plataforma cobas® (cobas®

4800; Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Angulo, Lopez-Rios, & Gonzalez, 2014). Para ello se realizó prueba de PCR en tiempo real concebida para la identificación de las mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). De forma similar, la identificación de mutaciones en el gen PIK3CA se realizaron a través la plataforma CLART® (Genomica) mediante PCR a tiempo real alelo específico para el estudio de 17 mutaciones en los exones 1, 4, 7, 9 y 20 del gen.

### **3.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de todas las variables incluidas en este trabajo, se realizó con el programa informático SPSS 21.0 (Software Programs, Chicago, IL, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con una  $p \leq 0.05$ . El estudio estadístico se centró en tres apartados. El primero descriptivo, donde se realizó un análisis de la distribución de frecuencias o de porcentajes en el caso de variables cualitativas, determinación de media  $\pm$  desviación estándar, mediana, rango de las variables cuantitativas. Un segundo apartado en el que se se hicieron comparaciones entre las variables cualitativas. Se utilizó el test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson, o el test exanto de Fisher cuando los casos esperados fueron menor que 5. Para la comparación entre variables cuantitativas se aplicó el test t-student (variable dicotoma) o el test ANOVA (análisis de varianza) en caso de presentar más categorías. Y el último apartado se dedicó al análisis de la supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier para conocer la probabilidad de sobrevivir a lo largo del tiempo a la enfermedad y influencia de las variables estudiadas en el pronóstico de la misma. Para conocer la significación estadística de la influencia de cada variable estudiada se utilizó el test Long-Rank (Mantel-Cox). Y finalmente, para determinar la asociación de los factores pronósticos que influían en la supervivencia de nuestra serie se seleccionó la regresión múltiple de riesgos proporcionales de Cox.





# 4. RESULTADOS

En la presente sección se describen los pacientes estudiados y los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos propuestos: 1) analizar en un grupo reducido de pacientes con CPNM (n=20) de acuerdo a los subtipos histológicos, adenocarcinoma (n=10) y carcinoma escamoso de pulmón (n=10), 2) seleccionar aquellas alteraciones genéticas que han mostrado una significación estadística con la histología o con las características clínicas y evolutivas de los pacientes para analizarlas en una serie más amplia de pacientes con CPNM (n=101), 3) determinar la incidencia de las alteraciones cromosómicas mediante FISH en los dos principales tipos histológicos del CPNM, y 4) determinar las regiones cromosómicas con valor pronóstico en cuanto a la supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE).

## 4.1 Características clínico-biológicas de la serie de pacientes analizados

En el presente trabajo se analizaron un total de 101 piezas de resección quirúrgica correspondientes a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico clasificados según la variante histológica del tumor, adenocarcinomas (n=53) y carcinomas escamosos (n=48), en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, cuyas características clínicas, biológicas y evolutivas se recogen en la Tabla 1. De los 101 pacientes analizados, 86 (85%) fueron varones y 15 (15%) mujeres, con edades comprendidas entre los 35 y los 86 años (media de  $66,6 \pm 8,2$ ). De acuerdo a la literatura, entre el grupo de los adenocarcinomas una gran parte de los tumores analizados fueron mujeres (73%), mientras que el 98% de los escamosos fueron varones ( $p < 0.001$ ). En cuanto a los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón, la mayoría de los tumores escamosos (56%) fueron fumadores con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) mostrando diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) frente al grupo de los adenocarcinomas (22%). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos histológicos para el resto de las características clínicas del paciente (edad, localización, tipo de cirugía, histología del tumor...). No obstante, merece destacar que el tipo de procedimiento quirúrgico más empleado fue la lobectomía y/o neumonectomía en la serie global de casos analizados (97%). Desde el punto de vista morfológico, predominaron los tumores de tamaño inferior a los 7cm y/o con agresividad local limitada, que se englobarían en pT1a-T1b (46%) y pT2a-T2b (40%), siendo

menos frecuentes los tumores operados pT3 (8%) y pT4 (5%). Según la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (TNM-UICC 2009) la mayoría de los casos estaban en estadios iniciales: el 59% de los pacientes se encontraban en estadio I y el 23% en estadio II. De los restantes pacientes, 18 (17%) estaban en estadio III, y tan solo un paciente (1%) se encontraba en estadio IV. La intención quirúrgica fue curativa en todos los pacientes, consiguiéndose una resección completa en el 95%. La mediana de supervivencia global (SG) fue de  $62\pm 66$  meses. Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos histológicos, la SG fue mayor en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos. ( $68\pm 72,3$  meses vs.  $44\pm 53,1$  meses; respectivamente). Ninguno de los pacientes estudiados presentó enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, aunque 41 (40%) de ellos desarrollaron metástasis durante la evolución de la enfermedad.

**Tabla 1. Características clínicas, biológicas y evolutivas de 101 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) de acuerdo a su histología.**

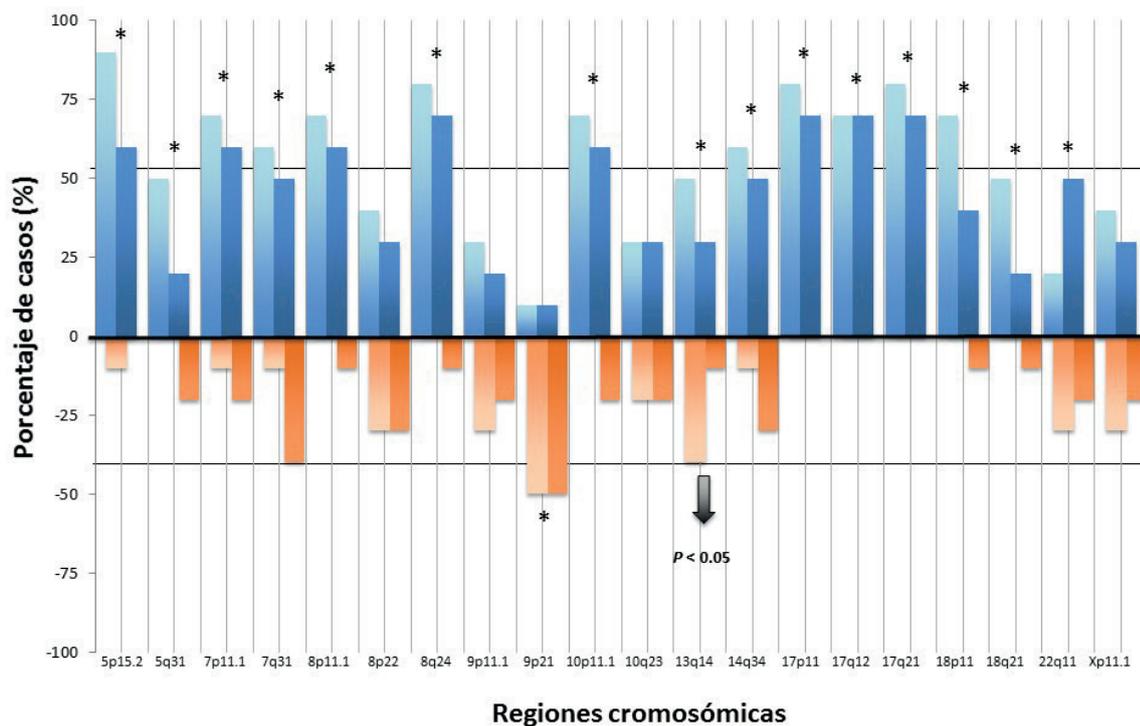
Características	Número de pacientes (%)		P	Total de casos (n=101)
	Adenocarcinomas (n=53)	Ca. Escamosos (n=48)		
<b>Género</b>				
Hombre	39 (74)	47 (98)	<b>0.001</b>	86 (85)
Mujer	14 (26)	1 (2)		15 (15)
<b>Edad (años)*</b>	64 (35-86)	66 (44-83)	NS	66 (35-86)
<b>Antecedentes personales</b>				
No fumador, no EPOC	22 (42)	1 (2)	<b>&lt; 0.001</b>	23 (23)
EPOC	3 (6)	2 (4)		5 (5)
Fumador	16 (30)	18 (38)		34 (34)
Fumador y EPOC	12 (22)	27 (56)		39 (38)
<b>Localización tumor</b>				
Lóbulo superior derecho	20 (38)	16 (33)	NS	36 (36)
Lóbulo medio	2 (4)	1 (2)		3 (3)
Lóbulo inferior derecho	7 (13)	7 (15)		14 (14)
Lóbulo superior izquierdo	18 (34)	12 (25)		30 (29)
Lóbulo inferior izquierdo	6 (11)	12 (25)		18 (18)
<b>Tipo de cirugía</b>				
Neumomectomía o lobectomía	50 (94)	46 (96)	NS	96 (95)
Segmentectomía	3 (6)	2 (4)		5 (5)
<b>Clasificación histopatológica</b>				
pT1a-pT1b	30 (57)	16 (33)	NS	46 (46)
pT2a-pT2b	19 (36)	22 (46)		41 (40)
pT3	3 (6)	6 (13)		9 (8)
pT4	1 (1)	4 (8)		5 (5)
<b>Afectación ganglionar</b>				
pN0	39 (74)	35 (73)	NS	74 (73)
pN1	5 (9)	8 (17)		13 (13)
pN2	9 (17)	5 (10)		14 (14)
<b>Afectación pleural</b>				
PL0	40 (76)	39 (81)	NS	79 (78)
PL1	9 (17)	6 (13)		15 (15)
PL2	4 (7)	3 (6)		7 (7)
<b>Estadio TNM</b>				
I	34 (64)	25 (52)	NS	59 (59)
II	9 (17)	14 (29)		23 (23)
III	9 (17)	9 (19)		18 (17)
IV	1 (2)	0		1 (1)
<b>Tipo de resección quirúrgica</b>				
R0	51 (96)	45 (94)	NS	96 (95)
R1	2 (4)	3 (6)		5 (5)
<b>Recidiva</b>				
No	30 (57)	24 (50)	NS	54 (53)
Si	23 (43)	24 (50)		47 (47)
<b>Metástasis a distancia</b>				
Si	33 (62)	27 (56)	NS	60 (60)
No	20 (38)	21 (44)		41 (40)
<b>Tipo de tratamiento</b>				
Local	38 (72)	30 (63)	NS	68
Sistémico	15 (28)	18 (39)		33
<b>Terapia adyuvante</b>				
Si	18 (36)	20 (42)	NS	38 (38)
No	35 (64)	28 (58)		63 (62)
<b>Éxito</b>	41 (77)	38 (78)	NS	79 (78)
<b>Seguimiento (meses)**</b>	61 ± 68,8	44 ± 51,1	NS	54 ± 62,5
<b>Supervivencia Global (meses)**</b>	68 ± 72,3	44 ± 53,1	NS	62 ± 66,0

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; R0: Sin tumor microscópico residual; R1: Sin tumor macroscópico residual pero con margen histológico positivo. NS – estadísticamente no significativo ( $p > 0.05$ )

Resultados expresados como porcentaje de casos y \*mediana (intervalo); \*\*Mediana ± DS

## 4.2 Incidencia de las alteraciones genéticas detectadas por FISH en cáncer de pulmón no microcítico

Inicialmente analizamos las anomalías cromosómicas en 20 casos, 10 adenocarcinomas y 10 carcinomas escamosos de pulmón, mediante técnicas de FISH empleando sistemáticamente sondas centroméricas y específicas de locus dirigidas a 20 regiones cromosómicas (figura 1). Además, estudiamos mediante técnicas de PCR el estado mutacional de los genes EGFR y PI3K y mediante FISH el reordenamiento de ALK y ROS-1, así como la amplificación de MET asociados al tratamiento de la enfermedad (tabla 2). Cabe destacar que las mutaciones en el gen EGFR fueron detectadas en el 20% de los adenocarcinomas sin detectarse en el grupo de los carcinomas escamosos. También es interesante resaltar que encontramos un caso de PI3K mutado, y que este correspondía a un carcinoma escamoso, de acuerdo a lo observado en la literatura. A pesar de ello, no hubo diferencias significativas entre ambos tipos histológicos.



**Figura 11. Alteraciones en el número de copias detectadas en pacientes con adenocarcinoma (n=10) versus carcinomas escamosos (n=10) detectadas mediante FISH.**

Se ilustran la frecuencia de las ganancias (en azul sobre el eje de las X) y las pérdidas (en naranja bajo el eje de las X) en el número de copias identificadas en pacientes con adenocarcinoma (colores claros) y carcinomas escamosos (colores oscuros). Las pérdidas de 13q14 han mostrado diferencias significativas entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos.

\* Anomalías cromosómicas frecuentes ( $\geq 50\%$ ).

**Tabla 2.** Alteraciones genéticas en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) detectadas por PCR (EGFR y PI3K) y FISH (ALK, ROS1 y MET) de acuerdo a su histología (n=20).

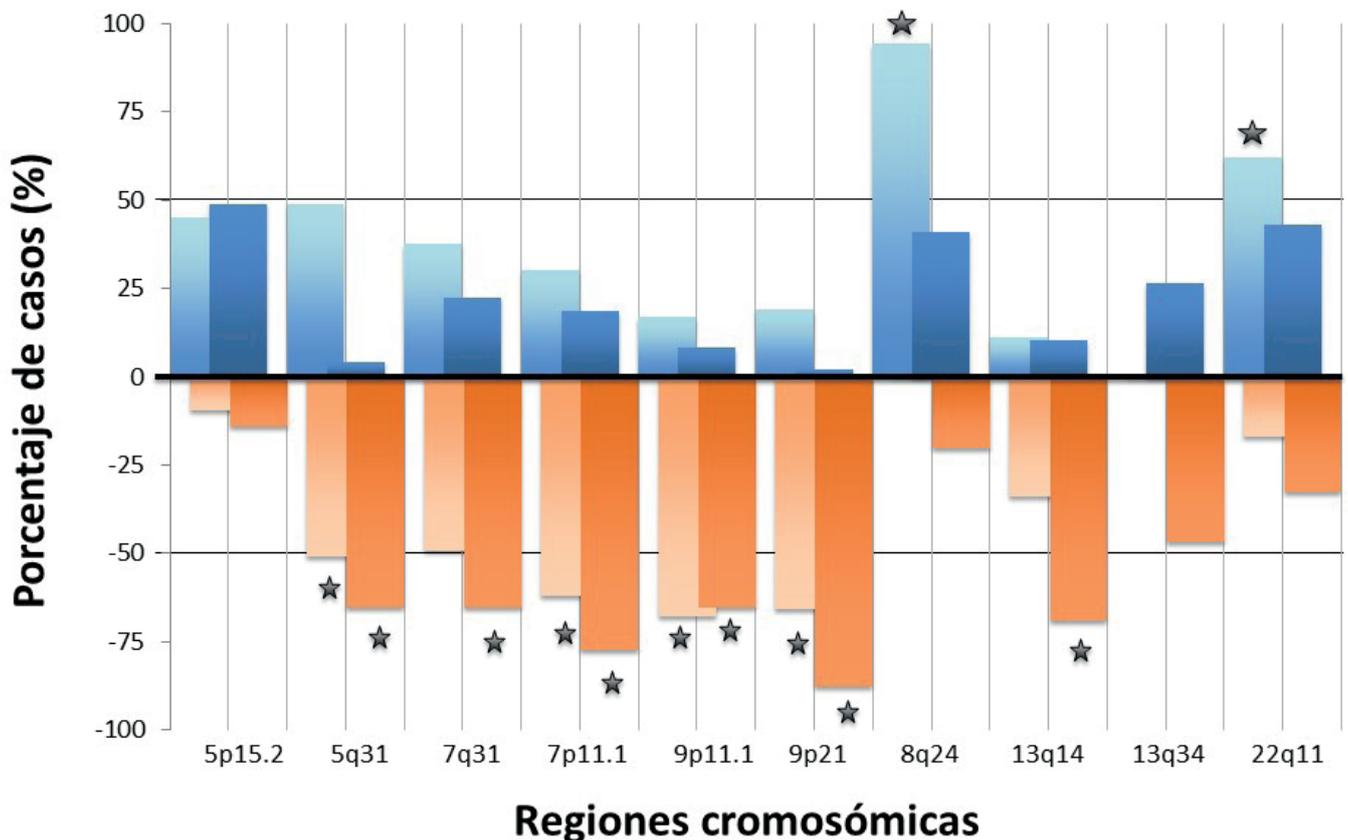
Gen	Número de pacientes (%)		P	Total de casos n=20 (%)
	Adenocarcinomas n=10	Ca. Escamosos n=10		
<b>EGFR</b>				
Mutado	2 (20)	0 (0)	NS	2 (10)
No mutado	8 (80)	10 (100)		18 (90)
<b>PI3K</b>				
Mutado	0 (0)	1 (10)	NS	1 (5)
No mutado	10 (100)	9 (90)		19 (95)
<b>ALK</b>				
Reordenado	0 (0)	0 (0)	NS	0 (0)
No reordenado	10 (100)	10 (100)		20 (100)
<b>ROS1</b>				
Reordenado	0 (0)	0 (0)	NS	0 (0)
No reordenado	10 (100)	10 (100)		20 (100)
<b>MET</b>				
Amplificado	0 (0)	0 (0)	NS	0 (0)
No amplificado	10 (100)	10 (100)		20 (100)

Resultados expresados como porcentaje de casos. NS – estadísticamente no significativo ( $p > 0.05$ )

Como se puede observar en la figura 11, las ganancias cromosómicas fueron más frecuentes que las pérdidas (50% vs. 16%; respectivamente). Las ganancias genéticas más frecuentemente observadas se localizaron en las regiones cromosómicas 5p15.2 (16/20; 80%), 8q24 (15/20; 80%), 17p11 (15/20; 80%), 17q11 (15/20; 80%) y 17q21 (15/20; 80%), mientras que las pérdidas cromosómicas correspondieron a las regiones 9p21 (10/20; 50%), 8p22 (6/20; 30%); 13q14 (6/20; 30%), 7q31 (5/20; 25%), 9p11.1 (5/20; 25%), 22q11 (5/20; 25%) y Xp11.1 (5/20; 25%). Merece destacar que las pérdidas a nivel de la región cromosómica 13q14 mostraron diferencias estadísticamente significativas a la hora de discriminar adenocarcinomas y carcinomas escamosos (40% vs. 10%; respectivamente;  $P=0.041$ ).

De todas las regiones cromosómicas analizadas, solo aquellas que marcaron una influencia significativa con las características clínicas de la enfermedad en los 20 pacientes inicialmente estudiados, fueron analizadas en un total de 101 pacientes con CPNM (figura 12). La alteración más frecuentemente observada fue la pérdida de 9p21, que apareció en el 77% de los casos. De forma global, con menor frecuencia, se observaron las ganancias cromosómicas en 8q24 (70/101; 69%), 22q11 (52/101; 51%) y 5p11.1 (43/101; 42%), y las pérdidas en 7q31 (71/101; 70%), 9p11.1 (68/101; 69%), 5q31 (59/101; 58%), 7p11.1 (59/101; 58%) y 13q14 (51/101; 50%). Varias de estas regiones mostraron diferencias

estadísticamente significativas diferenciando adenocarcinomas y carcinomas escamosos (tabla 3). Prácticamente todos los adenocarcinomas (59/53; 94%) ganaban 8q24 y ninguno lo perdía, mientras que un buen número de los carcinomas escamosos (19/48; 40%) no mostraban alteraciones en esta región ( $P < 0.001$ ). Por el contrario, al estudiar la región 9p21, su delección predominaba entre la histología escamosa (42/48; 88%) mientras que se encontraba ganada en un 19% de los adenocarcinomas (10/53) ( $P < 0.05$ ). Las alteraciones a nivel del cromosoma 13 también fueron capaces de discriminar entre las dos histologías. En el caso de 13q14, casi el 70% de los carcinomas escamosos perdían esta región cromosómica (33/48; 69%), mientras que entre los adenocarcinomas, era más frecuente no encontrar alteración alguna (29/53; 55%) ( $P = 0.001$ ). Es llamativo que ninguno de los casos de adenocarcinoma estudiados mostrara alteraciones en la región 13q34, mientras que se perdía en hasta un 58% (22/48) de los carcinomas escamosos ( $P < 0.01$ ).



**Figura 12. Alteraciones en el número de copias detectadas en pacientes con adenocarcinoma (n=53) versus carcinomas escamosos (n=48) detectadas mediante FISH.**

Se ilustran la frecuencia de las ganancias (en azul sobre el eje de las X) y las pérdidas (en naranja bajo el eje de las X) en el número de copias identificadas en pacientes con adenocarcinoma (colores claros) y carcinomas escamosos (colores oscuros). Las ganancias de 8q24\*\* así como las pérdidas de 9p21.1\*, 13q14\*\* y 13q24\*\* han mostrado diferencias significativas (\* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$ ) entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos.

★ Anomalías cromosómicas frecuentes ( $\geq 50\%$ ).

**Tabla 3. Alteraciones genéticas en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) detectadas por FISH de acuerdo a su histología (n=101)**

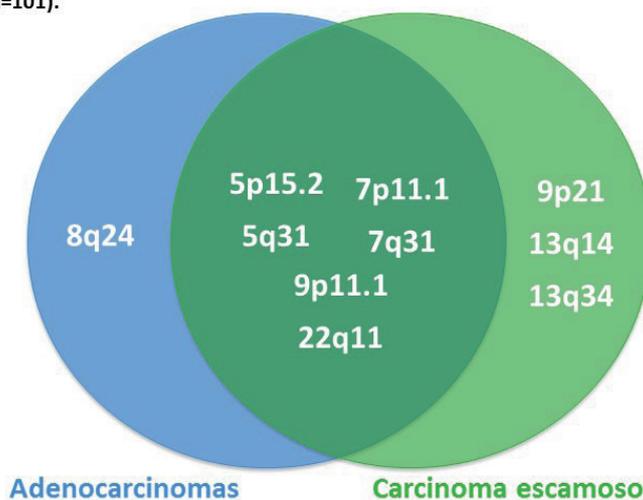
Región cromosómica	Número de pacientes (%)		P	Total de casos (n=101)
	Adenocarcinomas (n=53)	Ca. Escamosos (n=48)		
<b>Cromosoma 5p15.2* (n=97)</b>				
Pérdida	5 (10)	7 (15)	NS	12 (12)
Normal	26 (53)	18 (37)		44 (45)
Ganancia	18 (37)	23 (48)		41 (43)
<b>Cromosoma 5q31* (n=99)</b>				
Pérdida	27 (53)	31 (65)	NS	58 (59)
Normal	15 (29)	15 (31)		30 (30)
Ganancia	9 (18)	2 (4)		11 (11)
<b>Cromosoma 7p11.1* (n=100)</b>				
Pérdida	26 (50)	31 (65)	NS	57 (57)
Normal	7 (14)	6 (12)		13 (13)
Ganancia	19 (37)	11 (22)		30 (30)
<b>Cromosoma 7q31* (n=100)</b>				
Pérdida	33 (64)	37 (77)	NS	70 (70)
Normal	4 (8)	2 (4)		6 (6)
Ganancia	15 (29)	9 (19)		24 (24)
<b>Cromosoma 8q24</b>				
Pérdida	0 (0)	10 (20)	< 0.001	10 (10)
Normal	3 (6)	19 (40)		22 (21)
Ganancia	50 (94)	19 (40)		69 (69)
<b>Cromosoma 9p21</b>				
Pérdida	35 (66)	42 (88)	0.015	77 (77)
Normal	8 (15)	5 (10)		13 (13)
Ganancia	10 (19)	1 (2)		11 (11)
<b>Cromosoma 9p11.1</b>				
Pérdida	36 (68)	32 (65)	NS	68 (67)
Normal	8 (15)	12 (27)		20 (20)
Ganancia	9 (17)	4 (8)		13 (13)
<b>Cromosoma 13q14</b>				
Pérdida	18 (34)	33 (69)	0.001	51 (51)
Normal	29 (55)	10 (21)		39 (39)
Ganancia	6 (11)	5 (10)		11 (10)
<b>Cromosoma 13q34* (n=81)</b>				
Pérdida	0 (0)	22 (58)	< 0.001	22 (28)
Normal	43 (77)	13 (34)		56 (68)
Ganancia	0 (0)	3 (8)		3 (4)
<b>Cromosoma 22q11* (n=99)</b>				
Pérdida	9 (17)	16 (33)	NS	25 (25)
Normal	11 (22)	12 (25)		23 (23)
Ganancia	31 (61)	20 (42)		51 (52)
<b>Focos de amplificación del cromosoma 22q11</b>				
Sí	9 (17)	4 (8)	NS	13 (13)
No	44 (83)	44 (92)		88 (87)

Resultados expresados como porcentaje de casos; NS – estadísticamente no significativo ( $p > 0.05$ )

\* Omisión de casos debido a falta de material

Atendiendo a todas estas diferencias, se podrían resumir gráficamente como muestra la figura 13.

Figura 13. Alteraciones genéticas en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) detectadas por FISH de acuerdo a su histología (n=101).



Una vez establecida la incidencia individual de alteraciones para cada región cromosómica analizada en los CPNM nos centramos en determinar la posible existencia de asociaciones entre dos o más alteraciones cromosómicas (tabla 4). En este sentido, en los adenocarcinomas, encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre las pérdidas de los cromosomas 5q31, 7q31, 7p11.1 y 9p11.1. Por otro lado los tumores que no muestran alteraciones de los cromosomas 5p15.2 y 13q14 se asocian la pérdida de 5q31. La monosomía de 9p11.1 se asocia, a su vez, con la monosomía de 9p21 y la ganancia de 8q24. Análogamente, en los carcinomas escamosos encontramos que las pérdidas de 5q31, 7p11.1, 7q31 y 9p11 están interrelacionadas de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, en el carcinoma escamoso, la ausencia de alteraciones a nivel de 8q24 se relaciona con las anomalías de 7p11.1, 7q31, 9p11 y 22q11. En su conjunto, las correlaciones observadas entre las diferentes anomalías cromosómicas encontradas, tanto en adenocarcinomas como en carcinomas epidermoides, apoyan la hipótesis de la existencia de diferentes clones y vías de aneuploidización asociadas a inestabilidad cromosómica en el carcinoma de pulmón no microcítico.

Tabla 4. Correlación entre el número de señales detectadas por FISH en cada región cromosómica en adenocarcinomas (n=53) y carcinomas escamosos (n=48).

	5p15.2	5q31	7p11.1	7q31	8q24	9p11.1	9p21	13q14	13q34	22q11
5p15.2		.46						.36		
5q31			.48	.54		.58		.44		
7p11.1		.59		.90				.34		
7q31		.42				.36		.38		
8q24	.39		.40	.39		.30				
9p11.1		.37		.40	.43		.55	.47		
9p21						.50				
13q14										
13q34									.73	
22q11										.32

Los resultados se muestran como coeficientes de correlación de Pearson ( $R^2$ ); los espacios vacíos se corresponden con correlaciones entre las regiones cromosómicas cuyo coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) es menor de 70. En negrita cuando la significación es  $p < 0,01$  y sin negrita cuando la significación es  $p < 0,05$ .

#### 4.3 Significado de los cambios genéticos detectados mediante FISH en el comportamiento clínico-patológico y evolutivo de la enfermedad

La correlación entre las características clínico-patológicas de la enfermedad y las alteraciones genéticas detectadas por FISH en los primeros 20 pacientes se recoge en las tablas 5 a 8. En cuanto a la clasificación T, tumores inferiores a 5cm con extensión local limitada se asociaron con las ganancias de 8q24, 8q11 y 17q21 (tabla 5). Los pacientes con afectación ganglionar mostraron con mayor frecuencia pérdidas en 9p11.1 sin presentar anomalías en 10p11.1 (tabla 6).

**Tabla 5. Relación entre las alteraciones genéticas y la clasificación T (TNM 2009) en pacientes (n=20) con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM)**

Regiones cromosómicas	Clasificación T (TNM 2009) (%)			P
	T1a-T1b (n=2)	T2a (n=16)	T2b (n=2)	
<b>Cromosoma 8q24</b>				
Pérdida	1 (50)	0 (0)	0 (0)	<b>0.04</b>
Normal	0 (0)	4 (25)	0 (0)	
Ganancia	1 (50)	12 (75)	2 (100)	
<b>Cromosoma 8q11</b>				
Pérdida	1 (50)	0 (0)	0 (0)	<b>0.03</b>
Normal	0 (0)	6 (38)	0 (0)	
Ganancia	1 (50)	10 (63)	2 (100)	
<b>Cromosoma 17q21</b>				
Normal	2 (100)	3 (19)	0 (0)	<b>0.03</b>
Ganancia	0 (0)	13 (81)	2 (100)	

Resultados expresados como porcentaje de casos

**Tabla 6. Relación entre las alteraciones genéticas y afectación de los ganglios linfáticos en pacientes (n=20) con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM)**

Regiones cromosómicas	Afectación ganglionar (%)		P
	Negativos (n=16)	Positivos (n=4)	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>			
Pérdida	2 (13)	3 (75)	<b>0.02</b>
Normal	10 (62)	0 (0)	
Ganancia	4 (25)	1 (25)	
<b>Cromosoma 10p11.1</b>			
Pérdida	2 (13)	0 (0)	<b>0.05</b>
Normal	5 (31)	4 (100)	
Ganancia	9 (56)	0 (0)	

Resultados expresados como porcentaje de casos

**Tabla 7. Relación entre las alteraciones genéticas y el tratamiento adyuvante en pacientes (n=20) con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM)**

Regiones cromosómicas	Tratamiento adyuvante (%)		P
	No (n=5)	Sí (n=15)	
<b>Cromosoma 9p21</b>			
Pérdida	1 (20)	9 (60)	<b>0.03</b>
Normal	2 (40)	6 (40)	
Ganancia	2 (40)	0 (0)	
<b>Cromosoma 17q21</b>			
Normal	5 (62)	1 (8)	<b>0.01</b>
Ganancia	3 (38)	11 (92)	

Resultados expresados como porcentaje de casos

La mayoría de los pacientes que recibieron tratamiento adyuvante mostraron pérdidas del cromosoma 9p21 y ganancias de 17q21 (tabla 7). En cuanto a las características evolutivas del tumor quedan reflejadas en la tabla 8. Los tumores que no mostraron ganancias de 7p11.1 y 7q31, así como pérdidas de 9p11 desarrollaron enfermedad metastásica durante la evolución. Finalmente, los pacientes cuyas en muestras tumorales no se observó ganancias de 7q31 y 8q24 tuvieron mayor tasa de mortalidad.

**Tabla 8. Relación entre las alteraciones genéticas y características evolutivas en pacientes (n=20) con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM)**

Regiones cromosómicas	Metástasis (%)		P	Éxito (%)		P
	No (n=8)	Sí (n=12)		No (n=11)	Sí (n=9)	
<b>Cromosoma 7p11.1</b>						
Pérdida	0 (0)	3 (25)	<b>0.03</b>	1 (9)	2 (22)	NS
Normal	0 (0)	4 (33)		1 (9)	3 (33)	
Ganancia	8 (100)	5 (42)		9 (82)	4 (45)	
<b>Cromosoma 7q31</b>						
Pérdida	0 (0)	5 (42)	<b>0.04</b>	2 (18)	3 (33)	<b>0.01</b>
Normal	1 (13)	3 (25)		0 (0)	4 (45)	
Ganancia	7 (87)	4 (33)		9 (82)	2 (22)	
<b>Cromosoma 8q24</b>						
Pérdida	0 (0)	1 (8)	NS	0 (0)	1 (11)	<b>0.02</b>
Normal	1 (13)	3 (25)		0 (0)	4 (44)	
Ganancia	7 (87)	8 (67)		11 (100)	4 (44)	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>						
Pérdida	0 (0)	5 (42)	<b>0.04</b>	2 (18)	3 (33)	NS
Normal	4 (50)	6 (50)		4 (36)	6 (67)	
Ganancia	4 (50)	1 (8)		5 (46)	0 (0)	

Resultados expresados como porcentaje de casos

Es interesante destacar que próximos a las regiones estudiadas se encuentran algunos genes relacionados con la proliferación celular (FGF10, EGFR, AKT-1, TOP3A, ERBB2, FOXN3, STAT3, RARA, TOP2A, LAMA3, MAPK4), genes supresores de tumores (APC, EGR-1, TUSC3, CDNK2A, CDNK2B, PTEN, RB-1, TP53, BCL2, NF1), oncogenes (MET, MYC), y otros genes descritos en distintas neoplasias, incluido el CPNM (SOX1, VOPP-1, PCM-1, RAB20, SMAD4, SERPINB13, BCR) (tabla 9).

**Tabla 9. Genes próximos a las regiones cromosómicas estudiadas en los pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) detectadas por FISH (n=101).**

<b>Regiones cromosómicas</b>	<b>Genes, marcados en negrita los involucrados en procesos neoplásicos y/o relacionados con el CPNM.</b>
<b>5p15.2</b>	<i>CTNND2A, ANKH, TRIO, CCT5, FAM173B, FAM105A, OTULIN, DNAH5, CMBL, MARCH6, DAP, ROPN1L, ANKRD33B</i>
<b>5q31</b>	<i>APC, TRIM23, ARSB, ALDH7A1, BHMT, BTF3, CAMK4, CAMLG, CAST, CCNB1, CCNH, CD14, CDC23, <b>EGR-1</b>, CSF2, CSNK1G3, VCAN, CTNNA1, DMXL1, DHFR, DIP1, HBEGF, EFNA5, ETF1, F2R</i>
<b>7p11.2</b>	<i>VSTM2A, SEC61G, <b>EGFR</b>, LANCL2, <b>VOPP1</b>, SEPT14, ZNF713, GBAS, MRPS17, PSPH, CCTGA, SUMF2, PHKG1, CHCHD2, NUPR2, ZNF479, ZNF716</i>
<b>7q31</b>	<i>TFEC, CAV2, <b>MET</b>, ST7, WNT2, ASZ1, CFTR</i>
<b>8p22</b>	<i>KIAA1456, DKCI, SGCZ, <b>TUSC3</b>, MSRI, MICU3, FGF20, ZDHHC2, CNOT7, VPS37A, MTMR7, SLC7A2, PDGFRL, MTUS1, FGL1, <b>PCM1</b>, ASAH1, NAT1, NAT2, PSD3</i>
<b>8q24</b>	<i><b>MYC</b>, PVT1, TMEM75</i>
<b>9p11</b>	<i>CBWD7, CNTNAP3B, ANKRD20A2,</i>
<b>9p21</b>	<i>MTAP, <b>CDKN2A, CDKN2B</b>, CMRTA-1, MLLT3, FOCAD, HACD4, IFN</i>
<b>10p11</b>	<i>LYZL1, SVIL, KIAA1462, MAP3K8, MTPAP, LYZL2, ZNF438</i>
<b>10q23</b>	<i>ATAD1, <b>PTEN</b>, KLLN, PAPSS2, RNL5, NUTM2D</i>
<b>13q14</b>	<i>LPARG, <b>RB1</b>, ITM2B, RCBTB2, CYSLRT2, MED4, NUDT15, SUCLA2</i>
<b>13q34</b>	<i>IRS2, COL4A1, COL4A2, <b>RAB20</b>, CARKD, <b>ING1</b>, CARS2, ANKRD10, ARHGEF7, TEX29, <b>SOX-1</b>, SPACA7, TUBGCP3, ATP11AUN, ATP11A, MCF2L, <b>CUL4A</b>, PASA3, CDC16</i>
<b>14q32</b>	<i>CDL11B, SERD3, CCNK, CCDC85C, HHIP-like 1, CYP46A1, EML-1, EVL, DEGS2, YY1, VRK1, PAPOLA, AK7, GSKIP, BDKRB1, <b>AKT1</b>, ARG2, CALM1, <b>FOXN3</b></i>
<b>17p11</b>	<i>PIGL, CENPV, UBB, TRPV2, LRRC75A, ZNF287, ZNF624, USP32PI, TNFRSF13B, MPRIP, PLD6, FLCN, COPS3, NT5M, MED9, PASD1, <b>TOP3A</b>, SMCR8</i>
<b>17q11</b>	<i><b>ERBB2</b>, KRS1, RNFAIP1, POLDIP2, <b>FOXN1</b>, RAB34, PROCA1, <b>TP53I13</b>, GIT, <b>SLC6A4</b>, NUFIP2, TAOK1, SSH2, ANKRD13B, ABHD15, CORO6, EFCAB5, NSRP1, BLMH, CPD, EVI2B, EVI2A, CDK5R1, <b>NF1</b>, OMG, GRB7, PNMT, TCAP, STARD3, IKZF3, MIEN1, PGAP3, MIR4728</i>
<b>17q21</b>	<i><b>STAT3</b>, MAP3K14, <b>TOP2A</b>, IFGBP4, GJD3, CDC6, <b>RARA</b>, MSL-1, WIPF-2, PMSD3, <b>BCRA-1</b></i>
<b>18p11</b>	<i><b>LAMA3</b>, NPC1, RBBP8, RIOK3, TMEM241, CABLES1, TTC39C, ANKRD29, MIR4741</i>
<b>18q21</b>	<i><b>BCL2</b>, CDH20, RNF152, PIGN, TNFRSF11A, ZCCHC2, PHLPP1, KDSR, SERPINB5, VPS4B, HMSD, CDH7, CYB5A, <b>DCC</b>, FECH, KDSR, GALR1, GRP, LMAN1, <b>SMAD4</b>, MBD1, MBP, MC4R, ME2, MYO5B, NARS, NFATC1, ATP8B1, <b>SERPINB13, MAPK4, LIPG</b></i>
<b>22q11</b>	<i>GNAZ, RSPH14, <b>BCR</b>, RAB36, SGSM1, PIWIL3, IRRRC75B, GGT1, GUCD1, UPB1</i>
<b>Xp11</b>	<i>RBM10, RGN, NDUFB11, USP11, CDK16, UBA1, ZNF157</i>

#### **4.4 Impacto de las características clínico-patológicas y de las alteraciones genéticas en la supervivencia libre de enfermedad**

De los 101 pacientes analizados en el presente estudio, 97 fueron intervenidos con intención curativa (R0), de ellos, 11 (11%) recidivaron en el primer año tras la cirugía, 7 fueron carcinomas escamosos (7%) y 4 adenocarcinomas (4%). Sin embargo, si observamos la serie a largo plazo, observamos que el número de casos que recidivan termina siendo casi el mismo en las dos histologías, 57% en adenocarcinomas y 51% en carcinomas escamosos.

La figura 14 y tabla 10 muestran las características clínico-patológicas relevantes de la enfermedad que tienen valor pronóstico en la aparición de recidiva en el grupo de los adenocarcinomas. De todas las características de la enfermedad, la edad, el sexo, la exposición al tabaco y/o la presencia de EPOC no presentaron impacto significativo en la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Fueron las características patológicas las que influyeron significativamente en la SLE. Los tumores <5 cm con extensión limitada a nivel local (pT1), mostraron una SLE significativamente mayor que los de mayor tamaño y/o mayor grado de infiltración local (pT2 y pT3, mediana de 141 meses vs 48 y 19 meses; respectivamente,  $P < 0.05$ ). De manera similar, la presencia de ganglios metastásicos (N1 y N2), afectación pleural (PL1 y PL2) y estadios avanzados (II y III).

Además de las características patológicas, algunas de las alteraciones genéticas estudiadas también mostraron una asociación estadísticamente significativa con el tiempo libre de recaída (tabla 11). Así, podemos observar que los pacientes con las pérdidas de 7p11.1 y 7q31 muestran una SLE significativamente más corta con respecto a los pacientes que ganan o no muestran alteración en estas regiones (mediana NA vs 141 y 13 meses;  $P = 0.010$ , y mediana de NA vs 141 y 3 meses;  $P = 0.001$ , respectivamente). De la misma manera, los pacientes con adenocarcinomas de pulmón que ganan la región 8q24 muestran una menor SLE con respecto a aquellos casos en los que dicha región no muestra alteraciones (mediana NA vs 31 meses;  $P = 0.014$ ).

**Tabla 10. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas sobre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=51)**

<b>Características</b>	<b>Nº de Casos</b>	<b>Mediana de SLE (meses)</b>	<b>Análisis univariante P</b>
<b>Género</b>			
Hombres	37	NA	NS
Mujeres	14	141	
<b>Edad (años)</b>			
< 65	27	50	NS
≥ 65	24	NA	
<b>Antecedentes</b>			
No fumador no EPOC	21	31	NS
Fumador	16	49	
EPOC	3	NA	
Fumador y EPOC	11	65	
<b>Clasificación T</b>			
pT1	29	141	<b>0.030</b>
pT2	19	48	
pT3	3	13	
<b>Afectación ganglionar</b>			
pN0	39	NA	<b>&lt; 0.001</b>
pN1	4	22	
pN2	8	21	
<b>Afectación pleural</b>			
PL0	39	141	<b>0.004</b>
PL1	9	NA	
PL2	3	10	
<b>Estadio TNM</b>			
I	34	72	<b>&lt; 0.001</b>
II	9	48	
III	8	21	
<b>Éxito</b>			
No	12	NA	NS
Sí	41	115	

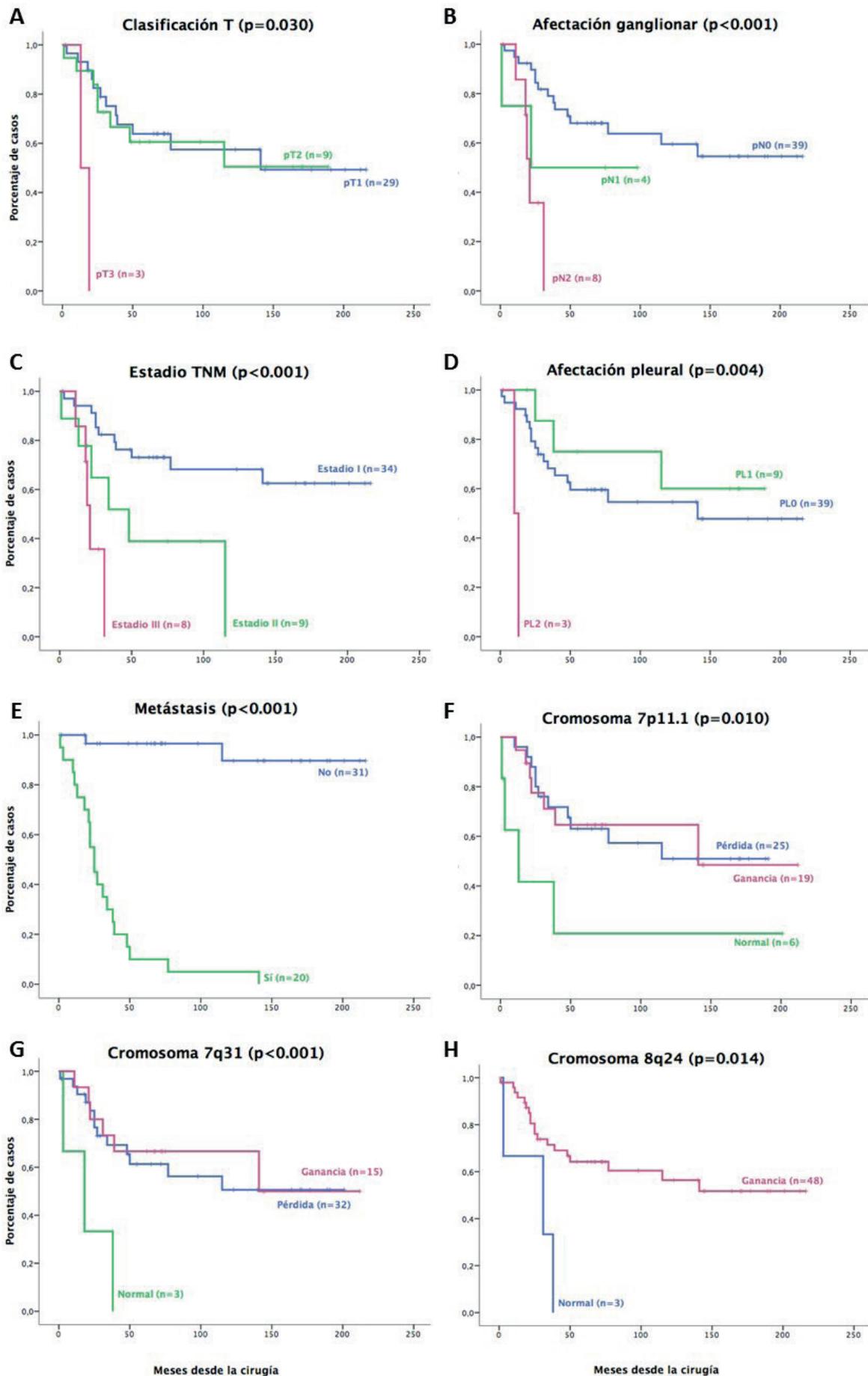
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0,05)

**Tabla 11. Impacto pronóstico de las características genéticas sobre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=51)**

Regiones Cromosómicas	Nº de casos	Mediana de SLE (meses)	Análisis Univariante P
<b>Cromosoma 5p15.2* (n=49)</b>			
Pérdida	5	115	NS
Normal	26	141	
Ganancia	18	77	
<b>Cromosoma 5q31* (n=51)</b>			
Pérdida	27	141	NS
Normal	15	48	
Ganancia	9	77	
<b>Cromosoma 7p11.1* (n=52)</b>			
Pérdida	26	NA	<b>0.010</b>
Normal	7	13	
Ganancia	19	141	
<b>Cromosoma 7q31</b>			
Pérdida	33	NA	<b>&lt; 0.001</b>
Normal	4	3	
Ganancia	15	141	
<b>Cromosoma 8q24</b>			
Pérdida	0	0	<b>0.014</b>
Normal	3	31	
Ganancia	50	NA	
<b>Cromosoma 9p21.1</b>			
Pérdida	35	115	NS
Normal	8	NA	
Ganancia	10	NA	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>			
Pérdida	36	50	NS
Normal	8	NA	
Ganancia	9	NA	
<b>Cromosoma 13q34* (n=43)</b>			
Normal	43	141	NS
<b>Cromosoma 13q14</b>			
Pérdida	18	39	NS
Normal	29	NA	
Ganancia	6	NA	
<b>Cromosoma 22q11* (n=49)</b>			
Pérdida	9	48	NS
Normal	11	115	
Ganancia	31	NA	
<b>Focos de amplificación del cromosoma 22q11</b>			
No	44	141	NS
Sí	9	25	

NA: No alcanza; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0.05)

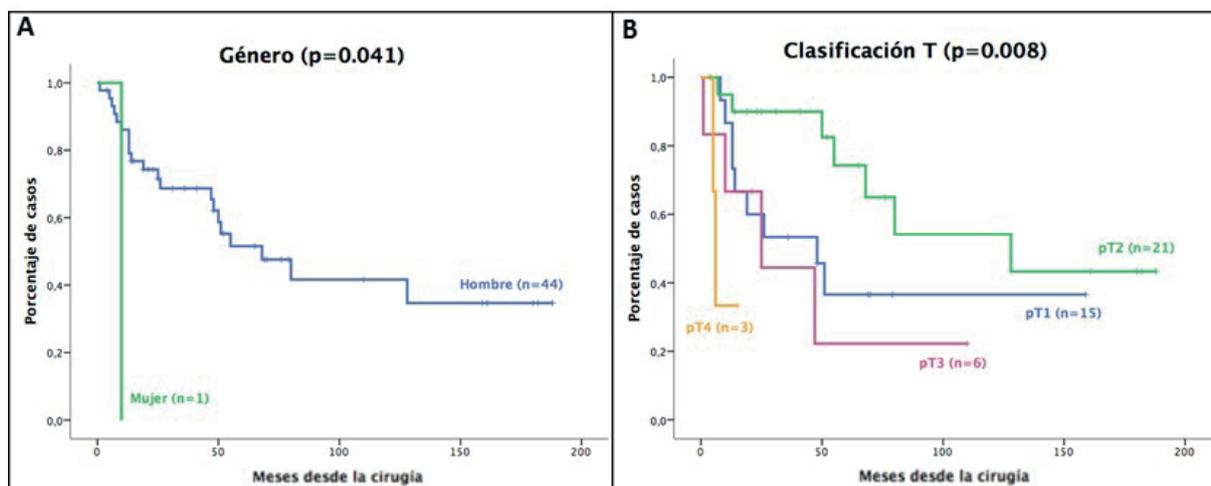
\* Omisión de casos debido a material insuficiente



**Figura 14.** Características clínico-biológicas y genéticas que han mostrado un impacto significativo en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el análisis univariante en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=51). (A) Clasificación T, (B) afectación de los ganglios linfáticos, (C) estadio TNM, (D) afectación pleural, (E) metástasis, (F) cromosoma 7p11.1, (G) cromosoma 7q31 y (H) cromosoma 8q24.

En el análisis multivariante de factores pronósticos asociados a recaídas mostró que la afectación pleural junto con las alteraciones a nivel de 9p11.1, 9p21 y 13q14 constituyen la mejor combinación de parámetros individuales a la hora de predecir la SLE en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. En base a estas cuatro variables, establecimos un sistema de puntuación para tratar de realizar una estratificación pronóstica de los pacientes. De forma que, a la ausencia de afectación pleural y un número normal de copias de las regiones 9p11.1, 9p21 y 13q14 les dimos un valor 0; mientras que a la afectación pleural (PL1 o PL2), las pérdidas de 9p11.1 y 13q14 y la ganancia de 9p21 les dimos un valor de 1. De acuerdo a la puntuación de estas variables, los pacientes que no mostraron ninguno de estos tres parámetros alterados obtuvieron una puntuación de 0 y fueron considerados de bajo riesgo. Los que mostraron un factor pronóstico alterado tuvieron una puntuación de 1 y fueron considerados de riesgo intermedio. Y aquellos que tenían dos o más parámetros alterados, fueron considerados de alto riesgo. Aunque no fue estadísticamente significativo, se observa que los pacientes que no tenían ninguno de los factores pronósticos alterados vivían más meses antes de la recidiva con respecto a los que tenían uno o más de uno alterados (mediana de 141 vs 38 y NA respectivamente;  $P > 0.05$ ).

En las tablas 12 y 13, así como en la figura 15, se detallan las variables clínico patológicas y genéticas pronósticas implicadas en el desarrollo de recidivas con respecto a los carcinomas escamosos que se operaron con intención curativa.



**Figura 15. Características clínico-biológicas que han mostrado un impacto significativo en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el análisis univariante en pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón (n=48).**  
 (A) Clasificación T y (B) afectación de los ganglios linfáticos.

Desde el punto de vista clínico-patológico, tan solo el género y la clasificación T mostraron significación estadística. En la variable escamosa, de los 45 casos R0 tan solo había una mujer, y su SLE fue significativamente menor que la de los restantes casos varones (10 meses vs 68 meses;  $P < 0.05$ ). Los tumores que tras el estudio patológico se clasificaron como T2 mostraron una SLE de 128 meses,

**Tabla 12. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas sobre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con carcinoma escamoso de pulmón (n=45)**

Características	Nº de Casos	Mediana de SLE (meses)	Análisis univariante P
<b>Género</b>			
Hombres	44	68	<b>0.041</b>
Mujeres	1	10	
<b>Edad (años)</b>			
< 65	16	51	NS
≥ 65	29	55	
<b>Antecedentes</b>			
No fumador no EPOC	1	10	NS
Fumador	18	68	
EPOC	2	48	
Fumador y EPOC	27	13	
<b>Clasificación T</b>			
pT1	15	48	<b>0.008</b>
pT2	21	128	
pT3	6	25	
pT4	3	6	
<b>Afectación ganglionar</b>			
pN0	34	80	NS
pN1	7	47	
pN2	4	13	
<b>Afectación pleural</b>			
PL0	38	80	NS
PL1	5	12	
PL2	2	25	
<b>Estadio TNM</b>			
I	24	80	NS
II	14	50	
III	7	47	
<b>Éxito</b>			
No	10	NA	NS
Sí	35	50	

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0,05)

**Tabla 13. Impacto pronóstico de las características genéticas sobre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con carcinoma escamoso de pulmón (n=45)**

<b>Regiones Cromosómicas</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Mediana de SLE (meses)</b>	<b>Análisis Univariante P</b>
<b>Cromosoma 5p15.2</b>			
Pérdida	6	NA	NS
Normal	17	50	
Ganancia	23	55	
<b>Cromosoma 5q31</b>			
Pérdida	30	80	NS
Normal	14	50	
Ganancia	2	26	
<b>Cromosoma 7p11.1</b>			
Pérdida	29	48	NS
Normal	6	128	
Ganancia	11	55	
<b>Cromosoma 7q31</b>			
Pérdida	35	48	NS
Normal	2	128	
Ganancia	9	NA	
<b>Cromosoma 8q24</b>			
Pérdida	8	48	NS
Normal	19	50	
Ganancia	19	NA	
<b>Cromosoma 9p21.1</b>			
Pérdida	40	39	NS
Normal	5	NA	
Ganancia	1	NA	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>			
Pérdida	30	68	NS
Normal	12	26	
Ganancia	4	55	
<b>Cromosoma 13q34* (n=36)</b>			
Pérdida	22	47	NS
Normal	11	128	
Ganancia	3	48	
<b>Cromosoma 13q14</b>			
Pérdida	31	55	NS
Normal	10	51	
Ganancia	5	NA	
<b>Cromosoma 22q11</b>			
Pérdida	16	50	NS
Normal	11	51	
Ganancia	19	55	
<b>Focos de amplificación del cromosoma 22q11* (n=45)</b>			
No	41	41	NS
Sí	4	NA	

NA: No alcanza; NS: Diferencias estadísticamente no significativas ( $p > 0.05$ )

\* Omisión de casos debido a material insuficiente

Cuando realizamos el análisis multivariante con todos los parámetros estudiados, observamos que la pérdida de 9p21 y la presencia de focos de amplificación en el cromosoma 22q11 eran factores pronósticos independientes para el desarrollo de recidiva. De hecho, los pacientes que presentaron ambos factores de forma conjunta fallecen antes (<23 meses), sin llegar a desarrollar recidiva de la enfermedad.

#### **4.5 Impacto de las características clínico-patológicas y de las alteraciones genéticas en la supervivencia global**

En los adenocarcinomas de pulmón no hemos encontrado ninguna variable clínica (género, edad o antecedentes de exposición al tabaco o de EPOC) con impacto pronóstico en la supervivencia global (SG). Sin embargo, todas las características patológicas y las relacionadas con el tratamiento mostraron significación estadística. De tal manera que una mayor clasificación T ( $P<0.01$ ), la afectación ganglionar, N1 o N2 ( $P<0.01$ ), la afectación de pleura parietal, PL2 ( $P<0.01$ ) y un estadio tumoral mayor ( $P<0.01$ ) entre las características patológicas, y el tratamiento sistémico ( $P<0.01$ ) y el recibir tratamiento adyuvante ( $P<0.05$ ), mostraron una influencia significativa como factores de mal pronóstico, asociándose a una SG significativamente menor (tabla 14).

Cuando analizamos las características genéticas estudiadas en los adenocarcinomas de pulmón (tabla 15), solamente los pacientes con pérdidas de 7q31 o sin alteraciones en esta región mostraron una mediana de supervivencia menor que los pacientes que ganaron dicha región cromosómica (mediana de 65 y 3 meses vs 141 meses respectivamente;  $P<0.01$ ).

Las curvas de supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con las características clínico-patológicas y genéticas con impacto pronóstico en la SG se recogen la figura 16.

**Tabla 14. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas sobre la supervivencia global (SG) en pacientes adenocarcinoma de pulmón (n=53)**

Características	Nº de Casos	Mediana de SG (meses)	Análisis univariante P
<b>Género</b>			
Hombres	39	33	NS
Mujeres	14	98	
<b>Edad (años)</b>			
< 65	27	79	NS
≥ 65	26	65	
<b>Antecedentes</b>			
No fumador no EPOC	22	79	NS
Fumador	16	61	
EPOC	3	123	
Fumador y EPOC	12	102	
<b>Clasificación T</b>			
pT1	30	123	< 0.001
pT2	19	79	
pT3	3	16	
pT4	1	8	
<b>Afectación ganglionar</b>			
pN0	39	123	< 0.001
pN1	5	98	
pN2	9	21	
<b>Afectación pleural</b>			
PL0	40	88	0.002
PL1	9	123	
PL2	4	8	
<b>Estadio TNM</b>			
I	34	144	< 0.001
II	9	98	
III	9	21	
IV	1	8	
<b>Tipo de cirugía</b>			
R0	51	88	< 0.001
R1	2	4	
<b>Recidiva de la enfermedad</b>			
No	30	140	NS
Sí	23	41	
<b>Metástasis durante la evolución</b>			
No	33	123	NS
Sí	20	41	
<b>Tipo de tratamiento</b>			
Local	38	140	0.004
Sistémico	15	36	
<b>Tratamiento adyuvante</b>			
No	35	36	0.016
Sí	18	140	

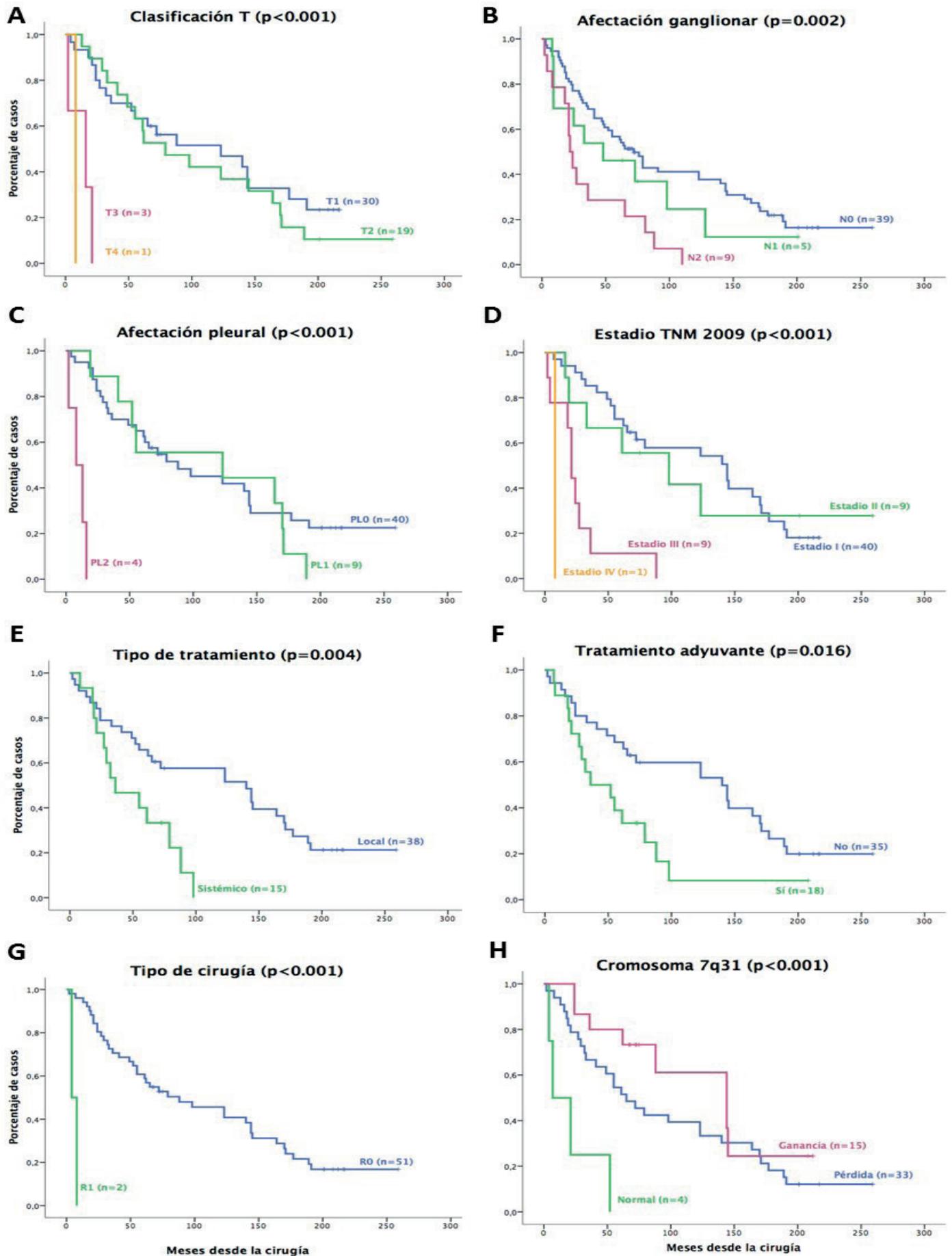
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0,05)

**Tabla 15. Impacto pronóstico de las características genéticas sobre la supervivencia global (SG) en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=53)**

<b>Regiones Cromosómicas</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Mediana de SG (meses)</b>	<b>Análisis Univariante P</b>
<b>Cromosoma 5p15.2* (n=49)</b>			
Pérdida	5	88	NS
Normal	26	55	
Ganancia	18	164	
<b>Cromosoma 5q31* (n=51)</b>			
Pérdida	27	72	NS
Normal	15	61	
Ganancia	9	189	
<b>Cromosoma 7p11.1* (n=52)</b>			
Pérdida	26	72	NS
Normal	7	16	
Ganancia	19	88	
<b>Cromosoma 7q31</b>			
Pérdida	33	65	<b>&lt; 0.001</b>
Normal	4	7	
Ganancia	15	144	
<b>Cromosoma 8q24</b>			
Pérdida	0	0	NS
Normal	3	52	
Ganancia	50	79	
<b>Cromosoma 9p21.1</b>			
Pérdida	35	61	NS
Normal	8	145	
Ganancia	10	123	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>			
Pérdida	36	55	NS
Normal	8	145	
Ganancia	9	164	
<b>Cromosoma 13q34* (n=43)</b>			
Normal	43	79	NS
<b>Cromosoma 13q14</b>			
Pérdida	18	61	NS
Normal	29	72	
Ganancia	6	NA	
<b>Cromosoma 22q11* (n=49)</b>			
Pérdida	9	88	NS
Normal	11	123	
Ganancia	31	65	
<b>Focos de amplificación del cromosoma 22q11</b>			
No	44	88	NS
Sí	9	41	

NA: No alcanza; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0.05)

\* Omisión de casos debido a material insuficiente



**Figura 16. Características clínico-biológicas y genéticas que han mostrado un impacto significativo en la supervivencia global (SG) en el análisis univariante en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=53).** (A) Clasificación T, (B) afectación ganglionar, (C) afectación pleural, (D) estadio TNM, (E) tipo de tratamiento, (F) tratamiento adyuvante, (G) tipo de cirugía y (H) cromosoma 7q31.

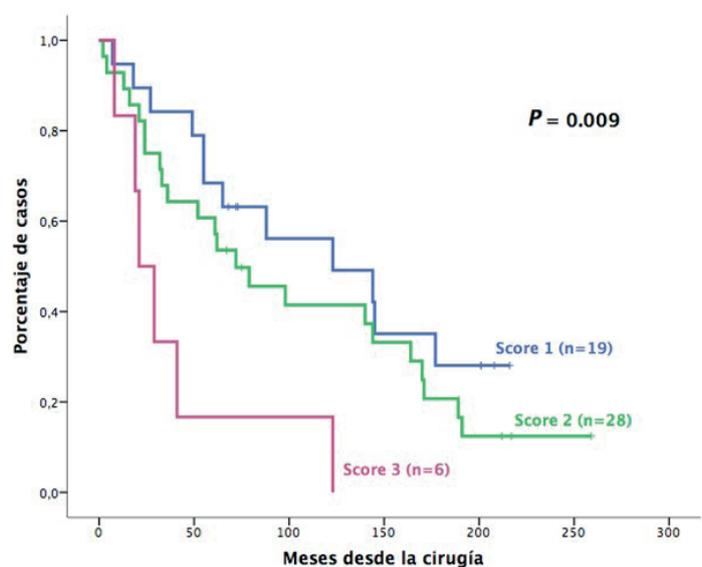
Una vez conocidas las características con valor pronóstico en el estudio univariante en la histología adenocarcinoma, realizamos un estudio multivariante. De todos los factores pronósticos analizados, la edad, los antecedentes de tabaquismo o ECPOC, la afectación de los ganglios linfáticos, la afectación pleural, el desarrollo de metástasis, los casos que no ganaban 5p15 y las pérdidas de 9p21 y 9p11 conforman la mejor combinación de parámetros para predecir la SG en los adenocarcinomas de pulmón. Establecimos un sistema de puntuación para tratar de realizar una estratificación pronóstica estos casos. Los valores que recibieron los distintos parámetros se resumen en la tabla 16. De manera que, de acuerdo a la puntuación obtenida, los pacientes con una suma  $\leq 2$  se clasificaron de bajo riesgo, los que sumaron un valor entre 3 y 4 se clasificaron como de riesgo intermedio, y los que obtuvieron  $\geq 5$  puntos se consideraron de alto riesgo.

La supervivencia de los pacientes clasificados como de bajo riesgo tenían una supervivencia significativamente mayor que no pacientes con clasificados como riesgo intermedio y alto riesgo (mediana de 123 meses vs 72 y 21 meses respectivametine;  $P=0.009$ ) (figura 17).

La SG en los carcinomas escamosos estaba influenciada negativamente por un mayor grado patológico dentro de la clasificación T ( $P<0.01$ ) y por el tratamiento sistémico ( $P<0.05$ ) (tabla 17). El resto de variables clínico-patológicas no mostraron significación estadística en el análisis univariante.

**Tabla 16. Sistema de puntuación para la estratificación pronóstica de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=53)**

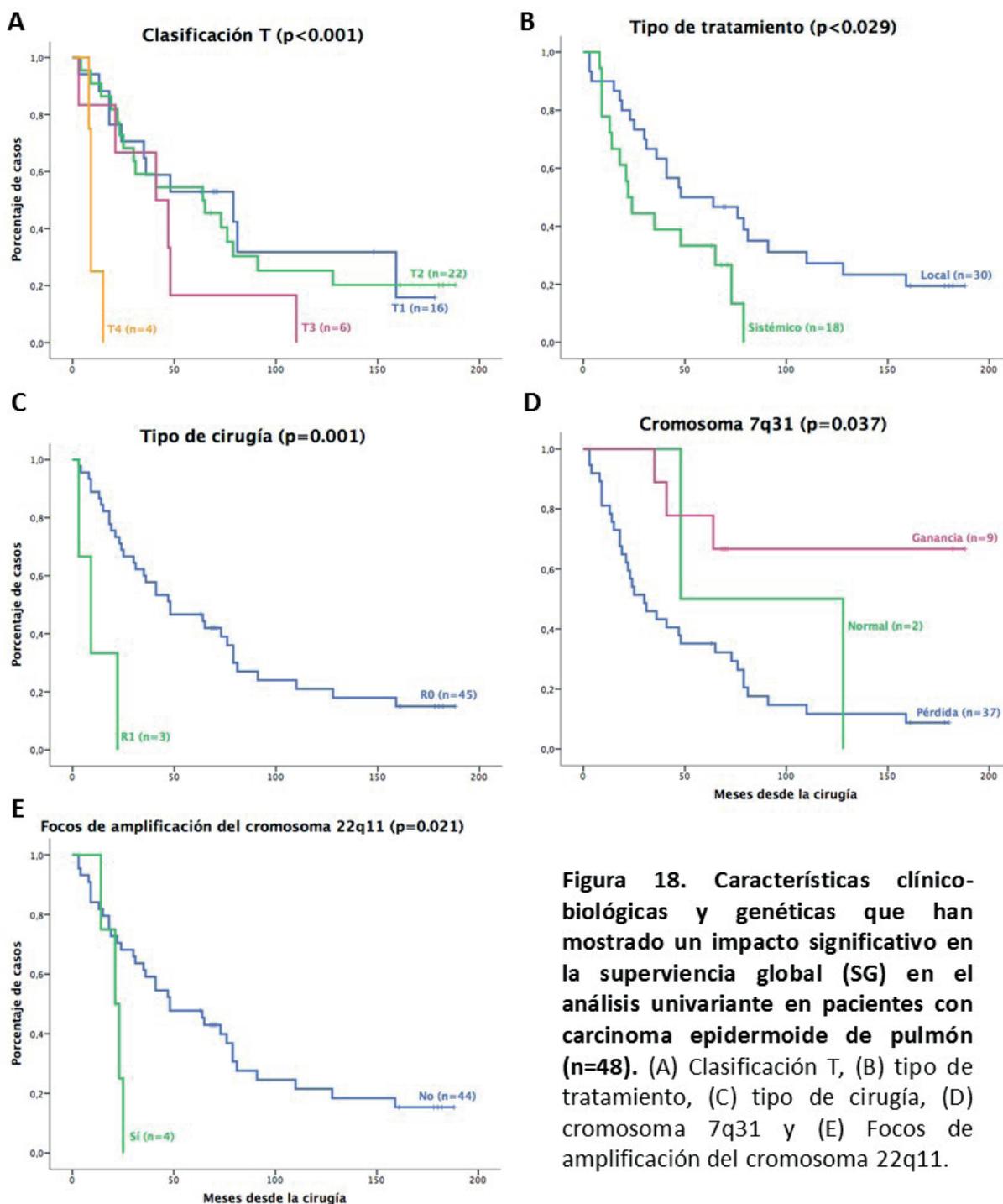
Factores pronósticos	Puntuación
<b>Antecedentes</b>	
No fumador no EPOC	0
Fumador EPOC	1
Fumador y EPOC	2
<b>Afectación pleural</b>	
PL0	0
PL1 / PL2	1
<b>Cromosoma 5p15.2</b>	
Pérdida	1
Normal / Ganancia	0
<b>Cromosoma 9p11.1</b>	
Pérdida	1
Normal / Ganancia	0
<b>Cromosoma 9p21</b>	
Pérdida	1
Normal / Ganancia	0
<b>Gradación final</b>	
Bajo riesgo	$\leq 2$
Riesgo intermedio	3-4
Alto riesgo	$\geq 5$



**Figura 17. Supervivencia global en adenocarcinomas de pulmón (n=53) basado en el sistema de estratificación pronóstica propuesto**

La SG en los carcinomas escamosos estaba influenciada negativamente por un mayor grado patológico dentro de la clasificación T ( $P<0.01$ ) y por el tratamiento sistémico ( $P<0.05$ ) (tabla 17). El resto de variables clínico-patológicas no mostraron significación estadística en el análisis univariante.

De las regiones cromosómicas estudiadas (tabla 18), las únicas con impacto significativo fueron la pérdida de 7q31 ( $P<0.05$ ) y la presencia de focos de amplificación ( $P<0.05$ ), que mostraron una menor SG con respecto a la ausencia de alteraciones de 7q31 o la ganancia de esta región (mediana de 30 meses vs 48 y NA respectivamente), y la ausencia de focos de amplificación de 22q11 (mediana de 21 meses vs 48 meses respectivamente) (figura 18).



**Figura 18.** Características clínico-biológicas y genéticas que han mostrado un impacto significativo en la supervivencia global (SG) en el análisis univariante en pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón ( $n=48$ ). (A) Clasificación T, (B) tipo de tratamiento, (C) tipo de cirugía, (D) cromosoma 7q31 y (E) Focos de amplificación del cromosoma 22q11.

**Tabla 17. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas sobre la supervivencia global (SG) en pacientes con carcinoma escamoso de pulmón (n=48)**

<b>Características</b>	<b>Nº de Casos</b>	<b>Mediana de SG (meses)</b>	<b>Análisis univariante P</b>
<b>Género</b>			
Hombres	47	47	NS
Mujeres	1	18	
<b>Edad (años)</b>			
< 65	17	41	NS
≥ 65	31	47	
<b>Antecedentes</b>			
No fumador no EPOC	1	18	NS
Fumador	18	36	
EPOC	2	23	
Fumador y EPOC	27	65	
<b>Clasificación T</b>			
pT1	16	48	< 0.001
pT2	22	64	
pT3	6	41	
pT4	4	9	
<b>Afectación ganglionar</b>			
pN0	35	41	NS
pN1	8	25	
pN2	5	65	
<b>Afectación pleural</b>			
PL0	39	48	NS
PL1	6	22	
PL2	3	14	
<b>Estadio TNM</b>			
I	25	48	NS
II	14	41	
III	9	22	
<b>Tipo de cirugía</b>			
R0	45	48	0.001
R1	3	9	
<b>Recidiva de la enfermedad</b>			
No	24	48	NS
Sí	24	35	
<b>Metástasis durante la evolución</b>			
No	27	48	NS
Sí	21	41	
<b>Tipo de tratamiento</b>			
Local	30	48	0.029
Sistémico	18	22	
<b>Tratamiento adyuvante</b>			
No	28	47	NS
Sí	20	24	

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0,05)

**Tabla 18. Impacto pronóstico de las características genéticas sobre la supervivencia global (SG) en pacientes con carcinoma escamoso de pulmón (n=48)**

<b>Regiones Cromosómicas</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Mediana de SG (meses)</b>	<b>Análisis Univariante P</b>
<b>Cromosoma 5p15.2</b>			
Pérdida	7	79	NS
Normal	18	47	
Ganancia	23	35	
<b>Cromosoma 5q31</b>			
Pérdida	31	36	NS
Normal	15	65	
Ganancia	2	35	
<b>Cromosoma 7p11.1</b>			
Pérdida	31	30	NS
Normal	6	25	
Ganancia	11	73	
<b>Cromosoma 7q31</b>			
Pérdida	37	30	<b>0.037</b>
Normal	2	48	
Ganancia	9	NA	
<b>Cromosoma 8q24</b>			
Pérdida	10	30	NS
Normal	19	47	
Ganancia	19	76	
<b>Cromosoma 9p21.1</b>			
Pérdida	42	41	NS
Normal	5	NA	
Ganancia	1	NA	
<b>Cromosoma 9p11.1</b>			
Pérdida	32	36	NS
Normal	12	41	
Ganancia	4	73	
<b>Cromosoma 13q14</b>			
Pérdida	33	41	NS
Normal	10	64	
Ganancia	5	48	
<b>Cromosoma 13q34* (n=38)</b>			
Pérdida	22	30	NS
Normal	13	65	
Ganancia	3	110	
<b>Cromosoma 22q11</b>			
Pérdida	16	73	NS
Normal	12	31	
Ganancia	20	25	
<b>Focos de amplificación</b>			
No	44	48	<b>0.021</b>
Sí	4	21	

CE: Carcinomas escamosos; NA: No alcanza; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>0.05) \* Omisión de casos por falta de material

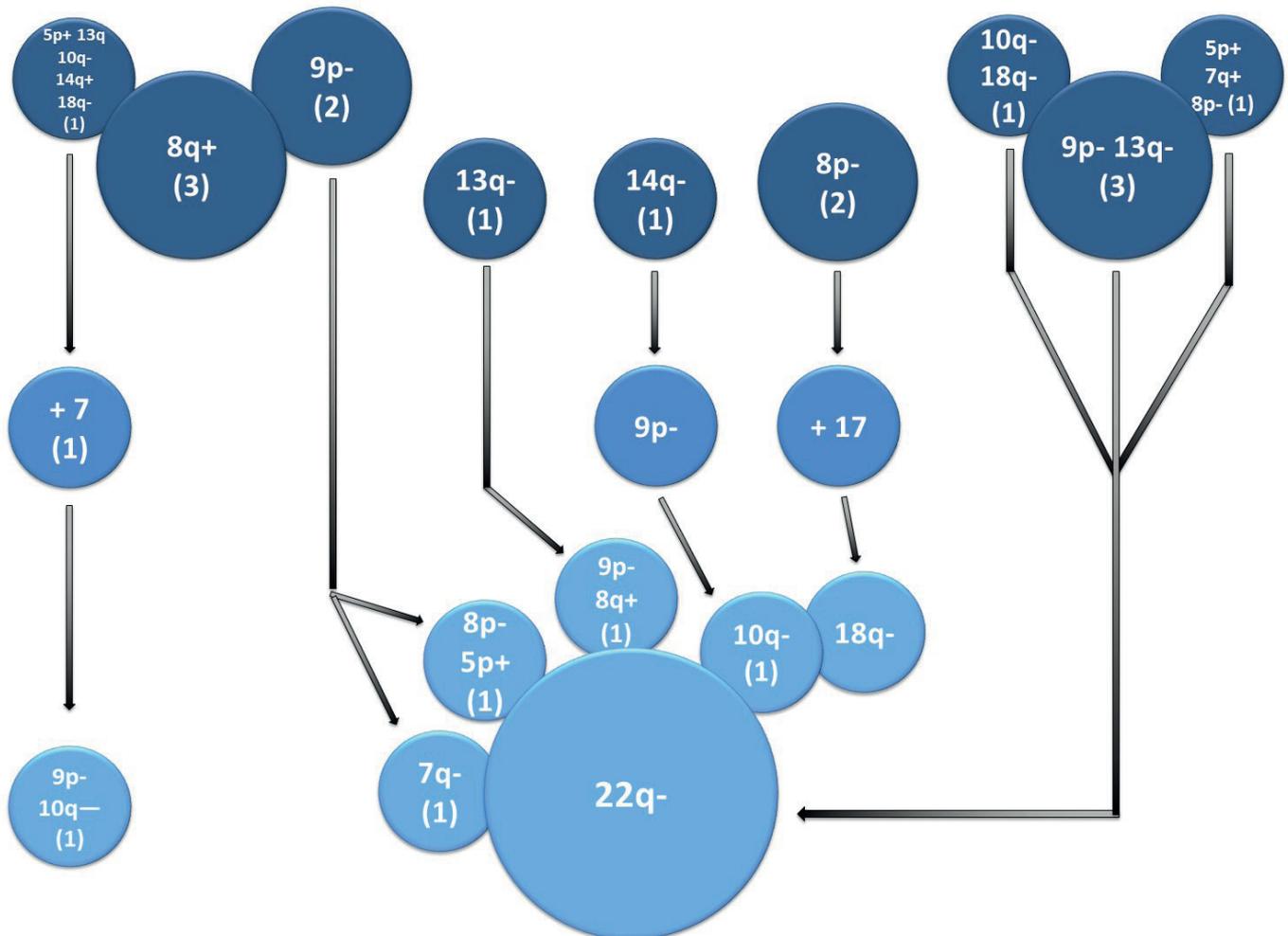
El análisis multivariante de los carcinomas escamosos de pulmón mostró que la mejor combinación de parámetros está constituida por las ganancias de 5p15, las ganancias de 13q34 y las ganancias de 22q11. Análogamente a lo realizado para los adenocarcinomas, en base a estas tres variables construimos un sistema de estratificación pronóstica. Las pérdidas de las regiones descritas recibieron un valor de 0 puntos; la ausencia de alteración, 1 punto; y la ganancia, 2 puntos. De acuerdo a este sistema de puntuaciones, los casos que obtuvieron de 0 a 2 puntos se consideraron de bajo riesgo, y aquellos que sumaron 3 o más puntos se consideraron de alto riesgo. Aunque no se alcanzó la significación estadística, los pacientes clasificados como de alto riesgo presentaron una tendencia a un SG más corta (mediana de 31 meses vs 73 meses respectivamente;  $P>0.05$ )

#### **4.6 Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en carcinoma de pulmón no microcítico**

El uso simultáneo de varias sondas mediante FISH nos permitió caracterizar cada uno de los clones tumorales presentes en las muestras analizadas, observando que en cada muestra coexisten dos o más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. De tal modo que para los 10 adenocarcinomas incluidos en el estudio preliminar tan solo uno tenía un único clon tumoral (10%); por el contrario de los 9 casos restantes, en la mayoría, 6 casos, se identificaron 2 clones tumorales (60%) y en 2 casos 3 clones (20%). Cuando estudiamos los carcinomas escamosos, en tres de los casos identificamos un solo clon tumoral, mientras que para el resto (70%) fuimos capaces de encontrar 2 clones tumorales. Si agrupamos los casos de acuerdo al tipo de alteración cromosómica encontrada en la célula ancestral del tumor, observamos que, tanto para adenocarcinomas (90%) como para carcinomas escamosos (60%), lo más frecuente es la delección de un locus específico. Si observamos las ganancias como alteración inicial, en los adenocarcinomas la región más frecuentemente ganada es 8q (30%), mientras que en los escamosos es 5p (40%). En ambas histologías, la mayoría de las alteraciones aparecen en distintas combinaciones, sin embargo, en el 40% de los adenocarcinomas encontramos una única alteración sin estar asociada a otras anomalías, serían en un caso la pérdida de 8p en dos casos, de 13q en uno, y de 14q en otro.

En las figuras 9 y 10 se resume el modelo hipotético de las vías de aneuploidización intratumoral más frecuentemente encontradas para las 20 regiones cromosómicas estudiadas en adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón. De acuerdo a este modelo, identificamos dos vías principales de

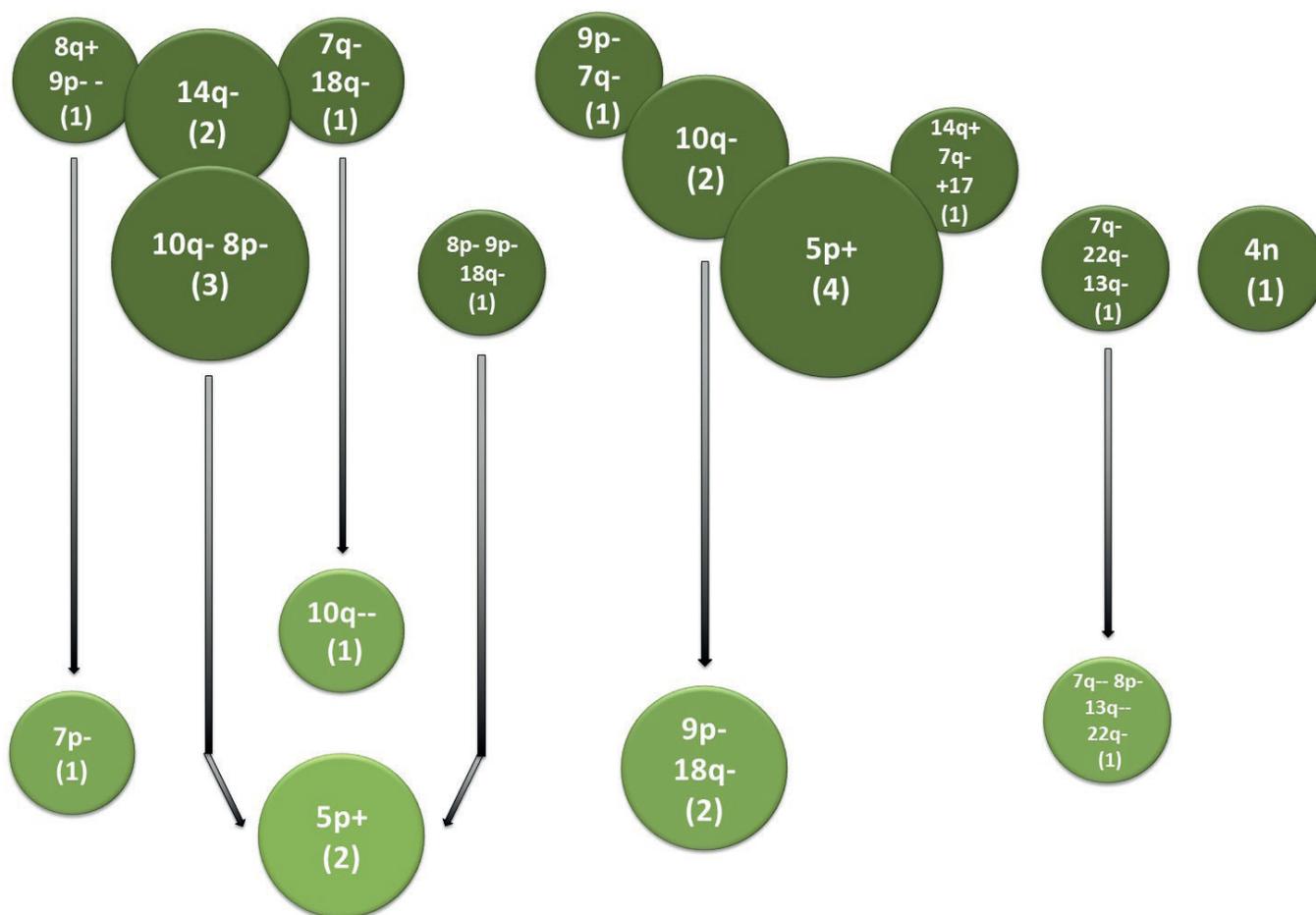
evolución clonal en los adenocarcinomas: una vía en la que se ganaría 8q y otra en la que se perderían inicialmente el cromosoma 13q y 9p. Hemos identificado otras vías menos frecuentes en las que el evento inicial sería la pérdida de 13q, la pérdida de 14q o la pérdida de 8p. Se identificarían clones intermedios en los que hemos podido observar la ganancia del cromosoma 7 (10%) y el cromosoma 17 (20%), y la pérdida de 9p (10%). Según este modelo hipotético, la pérdida de 22q sería un evento final en el 90% de los casos, asociado en distintas proporciones a otros eventos menos frecuentes. Tan solo encontramos un caso en el que sería una vía diferente perdiendo 9p y las dos copias de 10q.



**Figura 19. Heterogeneidad genética del adenocarcinoma de pulmón (n=10):** Modelo hipotético de evolución clonal asociado a la progresión maligna de los adenocarcinomas de pulmón. ■ Primer clon aneuploide ■ Segundo clon aneuploide ■ Tercer clon aneuploide

Por el contrario, al estudiar las alteraciones genéticas en los carcinomas escamosos podemos establecer dos vías de evolución principales una constituida por tres pacientes en la que las alteraciones del clon ancestral pierde 10q y 8p (30%) en combinación con la pérdida de 14q en dos de ellos, y con otras alteraciones menos frecuentes (nulisomía de 9p y pérdida de 8q en un caso y pérdida de 7q y 18q en otro). Y la otra vía principal en la que se gana 5p como alteración inicial. La ganancia de esta región la hemos encontrado con mayor frecuencia asociada a otras alteraciones de menor cuantía de entre las que destacaría la pérdida de 10q (20%). La tetraploidización, aunque puede ocurrir en estadios tempranos

en una pequeña proporción de los CPNM, constituye una etapa tardía en la evolución de muchos de estos tumores, nosotros la hemos observado en un único caso. Al observar los clones secundarios, la ganancia de 5p vuelve a ser un evento frecuente en este subtipo histológico (20%), y lo hemos observado en aquellos clones que en su inicio no presentaban esta alteración. El otro clon secundario frecuente es la pérdida de 9p asociado a la pérdida de 18q, observado en aquellos casos que inicialmente ganaban 5p. Otras anomalías observadas con menor frecuencia serían la pérdida de 7p (10%), la nulisomía de 10q (10%) y la combinación de nulisomía de 7q y 13q con pérdidas de 8p y 22q (10%).



**Figura 20. Heterogeneidad genética del carcinoma epidermoide de pulmón (n=10):** Modelo hipotético de evolución clonal asociado a la progresión maligna de los carcinomas epidermoides de pulmón. ■ Primer clon aneuploide ■ Segundo clon aneuploide





# 5 DISCUSIÓN

En la presente discusión comentaremos en primer lugar los hallazgos encontrados en relación a las variables clínico-patológicas y evolutivas de la enfermedad, para entrar posteriormente a discutir los resultados genéticos, punto central del presente estudio .

## 5.1. Análisis de las variables clínico-patológicas y evolutivas de la enfermedad.

En nuestra serie, la mediana de edad al diagnóstico del tumor fue de 66 años (63 para los adenocarcinomas y 66 para los carcinomas escamosos), próxima a la mediana de edad descrita previamente en los estudios epidemiológicos realizados en la población española (67 años) (Hernández-Hernández et al., 2010; Montero et al., 2003; Santos-Martínez et al., 2005). La mayoría de los pacientes analizados en nuestro estudio fueron varones (85%), sobre todo en la variante histológica escamosa (98%). Los últimos datos publicados por la OMS (Travis et al., n.d.), reflejan que el ratio varones/mujeres se ha reducido a tan solo 1,3. En este sentido, los patrones de este tipo de cáncer según las características demográficas tienden a correlacionarse sólidamente con los patrones históricos de prevalencia del consumo de cigarrillos. Este desequilibrio podría explicar la distribución por sexos en nuestra serie debido a una incorporación más tardía de las mujeres al hábito tabáquico en la población española. Estudios del año 2006 reflejan que la prevalencia del hábito tabáquico entre los 35-64 años es de un 39% en varones, mientras que en mujeres es del 27% (Hernández-García, Sáenz-González, & González-Celador, n.d.). De acuerdo con los datos publicados por la mayoría de las series revisadas (Molina et al., 2008) la histología escamosa presentó una fuerte asociación con el sexo masculino y con el hábito tabáquico. Mientras que, entre los adenocarcinomas, y coincidiendo con lo recogido en las publicaciones más recientes, un buen número de pacientes de nuestro estudio, (41%), eran no fumadores (Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, 2015; Travis, 2011).

Algunos de los autores han publicado que el daño inflamatorio crónico, la EPOC por ejemplo, es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de neoplasias de pulmón en fumadores (Stephen S Hecht, 2012). Un número importante de los pacientes de nuestro estudio (38%), presentaban ambos antecedentes. Caramori et al (Caramori et al., 2011) han relacionado ambos factores con el subtipo

escamoso del CPNM. En esta misma línea, también hemos observado esta asociación, dichos factores de riesgo estaban presentes de forma conjunta en el 55% de los carcinomas escamosos analizados (vs al 23% de los adenocarcinomas ( $P<0,01$ )).

La mayoría de los trabajos revisados reflejan que tan solo el 15% de los CPNM son diagnosticados cuando la enfermedad está aún localizada. Sin embargo, merece destacar que todos los pacientes de nuestra serie fueron quirúrgicos y la mayoría de ellos con un estadio bajo, el 59% en estadio I y el 23% en estadio II (Instituto De Salud Carlos III, 2004; Profile et al., 2014; Travis et al., n.d.; World Health Statistics, 2011). A pesar de que la resección quirúrgica es el tratamiento de elección más apropiado para este tipo de pacientes (Molina et al., 2008; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016; Scott et al., 2007), las tasas de recurrencia siguen siendo elevadas, oscilando entre el 28 y el 55% de los pacientes operados con intención curativa (R0) (Nakagawa et al., 2008; Song et al., 2014; Uramoto & Tanaka, 2014). De hecho, en nuestra serie, el porcentaje de recidivas está dentro de lo esperado (47%), no encontrando ninguna en el estadio IV, probablemente debido al fallecimiento precoz de estos casos ( $\leq 8$  meses tras la cirugía), encontrándose la mayor tasa de recidivas para el estadio II (65% frente al 36% del estadio I y 61% del estadio III;  $P<0.05$ ). Tal vez, esto sea debido a que en el estadio II en comparación con el estadio III, hay mayor proporción de pacientes con afectación pleural, además de que casi solo un tercio de los pacientes del estadio II recibieron tratamiento complementario, mientras que la proporción se invierte en los pacientes con estadio III siendo esta asociación estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ).

De todas las características clínicas e histopatológicas analizadas, la edad (Agarwal, Brahmanday, Chmielewski, Welsh, & Ravikrishnan, 2010; Goodgame et al., 2009; Guerrero et al., 2015), el género (Agarwal et al., 2010; Guerrero et al., 2015), la clasificación T (Rami-Porta et al., 2015; Riquet et al., 2014), la afectación ganglionar (Varlotto et al., 2015) y la afectación pleural (L. Jiang et al., 2015; H. Tao et al., 2013) constituyen los factores pronósticos de mayor valor predictivo en relación con la supervivencia libre de enfermedad (SLE). A pesar de los esfuerzos realizados por diferentes grupos para tratar de establecer sistemas de estratificación pronóstica (Guerrero et al., 2015; Oberije et al., 2015) basados en la combinación de algunos de estos parámetros, su grado de aceptación es bastante limitado. Ya que la mortalidad de los pacientes en estadio I tras la cirugía es bastante alta (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016) Guerrero et al (Guerrero et al., 2015) proponen un modelo de estratificación que permita seleccionar a ese 30% que no sobrevive a los 5 años. Analiza una serie de 848 pacientes en

los que objetiva que los parámetros edad, el sexo, las comorbilidades cardiovasculares, los valores de función respiratoria FEV1 y DLCO, el valor del SUVmax del tumor en el PET-TC, la afectación de los ganglios linfáticos, la invasión vascular, el estadio TNM y el grado histológico influyen significativamente en la supervivencia de los pacientes. Asigna una puntuación a cada uno de tal manera que obtiene dos grupos en los que a partir de 8 y 10 puntos existe un riesgo elevado y muy elevado respectivamente de morir antes de 5 años tras la cirugía. Sin embargo, no discrimina entre adenocarcinomas y carcinomas epidermoides, ni tiene en cuenta ningún parámetro molecular o genético en su estudio. El otro modelo predictivo que hemos encontrado es el de Oberije et al en el que estudian 548 pacientes en estadio III. De nuevo, este modelo solo tiene en cuenta características clínicas y de tratamiento de los pacientes, sin discriminar entre subtipos histológicos ni considerar alteraciones genéticas.

De acuerdo con la literatura (Agarwal et al., 2010; Goodgame et al., 2009; Guerrero et al., 2015; L. Jiang et al., 2015; Rami-Porta et al., 2015; Riquet et al., 2014; H. Tao et al., 2013; Varlotto et al., 2015), de todas las características clínico-patológicas de los pacientes analizados mostraron influencia pronóstica en relación con la SLE la clasificación T, la afectación ganglionar y pleural, así como el estadio TNM en el caso de los adenocarcinomas; y el género y la clasificación T en carcinomas epidermoides, en la SLE.

Parece claro que, a pesar de que la cirugía es un arma terapéutica fundamental en el tratamiento del CPNM, muchos de los pacientes operados necesitan un tratamiento adyuvante complementario, bien tras la cirugía o bien a partir del desarrollo de recidivas o enfermedad metastásica (Molina et al., 2008; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2016). En este sentido, el 38% de los pacientes de nuestro estudio necesitaron quimio o radioterapia en los meses posteriores a la cirugía, siendo quimioterapia el tratamiento de elección en 23 pacientes, radioterapia en 6 y ambas en 10 pacientes. Sin embargo, la toxicidad de los tratamientos quimioterápicos, particularmente los regímenes basados en taxanos (D'Addario et al., 2005; Yan Wang et al., 2014), añade intensidad a la búsqueda de nuevas moléculas basadas en el comprensión de la biología y el conocimiento a nivel genético de adenocarcinomas y carcinomas escamosos. El desarrollo de agentes antiangiogénicos e inhibidores de la tirosin kinasasa (ITK) ha mejorado las tasas de respuesta, pero solamente para grupos de pacientes con CPNM muy seleccionados y con la presencia de un biomarcador muy específico, como EGFR, ALK o ROS-1 en el caso de los adenocarcinomas (Molina et al., 2008).

El cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, a pesar que su incidencia se está frenando lentamente en los países desarrollados (Ferlay et al., 2013; Jemal et al.). Por ello, desde hace tiempo, se tratan de identificar los factores pronósticos que pudieran predecir, en el momento del diagnóstico, a saber qué pacientes necesitan tratamiento adyuvante y en qué momento de la evolución es más aconsejable hacerlo. Actualmente, conocemos el impacto pronóstico de distintas características clínicas asociadas a la supervivencia global (SG). Entre estas, se asocian con una menor SG el sexo masculino (Agarwal et al., 2010; Chang et al., 2007; Guerrero et al., 2015; Riquet et al., 2014), la edad avanzada (Agarwal et al., 2010; Chang et al., 2007; Riquet et al., 2014), la resección quirúrgica completa (Agarwal et al., 2010; Chang et al., 2007), una clasificación T mayor (Agarwal et al., 2010; Chang et al., 2007; Rami-Porta et al., 2015; Riquet et al., 2014), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (Riquet et al., 2014; H. Tao et al., 2013; Varlotto et al., 2015) así como de la pleura (L. Jiang et al., 2015)(Rami-Porta et al., 2015; H. Tao et al., 2013), el estadio TNM (Chansky et al., 2009; Guerrero et al., 2015), y la necesidad de tratamiento adyuvante (D'Addario et al., 2005; Yan Wang et al., 2014). En el presente trabajo, nos hemos centrado en determinar cuáles de estos factores pronósticos muestran influencia en la progresión de los pacientes con CPNM en sus distintas histologías. En este sentido, hemos comprobado que una alto grado dentro de la clasificación T del tumor, la presencia de ganglios metastásicos (N2), la afectación de pleura parietal (PL2) y los estadios avanzados son factores que influyen negativamente la evolución de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Mientras que en la histología escamosa, tan solo la clasificación T ha resultado estadísticamente significativa en el análisis univariante.

## **5.2. Estudio de las variables genéticas**

### **5.2.1. Incidencia de las alteraciones numéricas de cromosomas en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)**

Todos los casos de CPNM analizados en el presente trabajo mostraban al menos una anomalía cromosómica, siendo lo más frecuente encontrar alteradas la mayoría de las regiones estudiadas, de acuerdo a los hallazgos previos de otros autores (Baik et al., 2009; Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; J. U. Kang et al., 2008; Kerr, 2001b; Pei et al., 2001; Project & Network Genomic Medicine, 2013; Shen et al., 2009; Staaf et al., 2013; Sy et al., 2004; Tai et al., 2004; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Yakut et al., 2006). En las muestras de CPNM estudiadas predominaban las pérdidas; sin embargo, en

la bibliografía revisada predominan las ganancias frente a las pérdidas (Staaft et al., 2013; Yakut et al., 2006). Si bien, en la mayoría de los artículos que analizan este hecho, los estudios se realizaron en la totalidad de los cromosomas. Si nos centramos en las regiones estudiadas en el presente trabajo, los hallazgos obtenidos si son concordantes con la literatura (Baik et al., 2009; Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; J. U. Kang, Koo, Kwon, Park, & Kim, 2009; Kerr, 2001b; Pei et al., 2001; Shen et al., 2009; Staaft et al., 2013; The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013).

La alteración cromosómica más frecuentemente observada en nuestro estudio fue la delección/monosomía del cromosoma 9p-, detectada en casi las tres cuartas partes de los pacientes estudiados (n=77, 77%). Las alteraciones del brazo corto del cromosoma 9 se han observado como un evento temprano en la transformación maligna de la célula en el cáncer de pulmón no microcítico, sobre todo en pacientes fumadores (Kerr, 2001b; H. Nakanishi et al., 2009). Su delección podría ir asociada a la pérdida de genes supresores de tumores como CDKN2 o p16, que actúa bloqueando la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular, y por tanto, frenando la proliferación. Próximo a éste se encuentra MTAP, cuya deficiencia o pérdida de función se ha descrito en múltiples tumores posicionándolo como un candidato a gen supresor de tumores (Christopher, Diegelman, Porter, & Kruger, 2002). Algunos autores han descrito la codelección de MTAP y p16 como factor de mal pronóstico y recaída temprana en pacientes con cáncer, tanto de pulmón, como en otros tumores sólidos. Su et al., han estudiado que, aunque si bien es cierto que la pérdida de expresión de p16 y MTAP indica una peor evolución de la enfermedad, la pérdida de MTAP es factor pronóstico independiente (Basu et al., 2007; Cowan & Francke, 1991; Hustinx et al., 2005; Kamatani, Yu, & Carson, 1982; Kim et al., 2011; Kirovski et al., 2011; Su et al., 2014).

Además de la delección/monosomía de 9p21, hemos encontrado otras pérdidas cromosómicas que afectaban preferentemente a los cromosomas 7q-, 5q-, 7p- y 13q-. La menor frecuencia de estas alteraciones con respecto a la delección/monosomía del cromosoma 9p-, indicaría que estas alteraciones podrían representar cambios genéticos primarios de menor importancia en el CPNM o cambios secundarios asociados a la progresión tumoral, como ya se ha comentado en la introducción. De entre ellas, hemos de destacar la pérdida del brazo largo del cromosoma 13q-, donde se localiza entre otros el gen supresor de tumores RB. Se ha descrito la asociación de alteraciones en la vía de gen RB con una menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con adenocarcinomas de pulmón en estadios iniciales (S. Choi et al., 2015).

Las ganancias más frecuentemente encontradas correspondieron a 8q24, 22q11 y 5p15.2. C-MYC (8q24) es un oncogen bien caracterizado que está involucrado en el crecimiento celular, la diferenciación, el metabolismo y la apoptosis (Coller et al., 2000). Tradicionalmente, sus alteraciones, principalmente amplificaciones, se han asociado a los carcinomas de célula pequeña del pulmón (Flacco et al., 2015a). Aunque son pocos los artículos que exploran la relación de C-MYC con el CPNM, recientemente se han publicado varios artículos a este respecto (Flacco et al., 2015b; Iwakawa et al., 2011; Ozkara, Ozkara, Topçu, & Criss; Zhi et al., 2015).

Hasta la fecha, en nuestro conocimiento, ningún artículo publicado ha relacionado las ganancias del cromosoma 22q11 con el CPNM, en especial, la amplificación de esta región con la variante histológica escamosa. Sí se han descrito artículos en la literatura que establecen una relación similar entre las ganancias del cromosoma 22q11 y los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (Matsumura et al., 2000). Se ha descrito en esta región el gen PRKM1 (Gonzalez, Raden, Rigby, & Davis, 1992). Es un mediador importante en la transducción de señales de los receptores de factores de crecimiento, y su activación y/o sobreexpresión en varios cánceres, por lo que su ganancia estaría en relación con el desarrollo de esta enfermedad (Hoshino et al., 1999; Matsumura et al., 2000).

En cuanto a la región 5p15.2, hTERT, su ganancia se ha relacionado tradicionalmente con las lesiones preneoplásicas de ambos subtipos histológicos (Lantuejoul et al., 2005; K. Nakanishi et al., 2002). La subunidad catalítica de la transcriptasa reversa telomerasa humana (hTERT), restaura la longitud de los telómeros en las células tumorales, es esencial para la proliferación tumoral, convirtiéndolas en inmortales (Lantuejoul et al., 2005). Se ha descrito la amplificación de hTERT en múltiples cánceres, entre ellos el CPNM (A. Zhang et al., 2000), además de en lesiones preneoplásicas de ambos subtipos histológicos (Lantuéjoul, Salon, Soria, & Brambilla, 2007; K. Nakanishi et al., 2002). Yoo et al. han relacionado la ganancia de 5p15 con otras alteraciones genéticas, pero solo en la variante escamosa, siendo un factor predictivo independiente de mal pronóstico en la evolución de la enfermedad (Yoo et al., 2010).

En nuestro estudio, muchas de estas ganancias se asociaban a los clones polisómicos, sobre todo, tri y tetraploides. La presencia de estos clones tri y tetraploides es un evento no inicial en nuestra serie, salvo en uno de los casos de carcinoma escamoso. Algunos autores han relacionado este fenómeno con la inestabilidad genética asociándolo a mal pronóstico en CPNM (Nakamura et al., 2003). Además

de la presencia de dos o menos copias de algunos de los genes estudiados, han sido muy frecuentes las monosomías del cromosoma 8p-, del cromosoma 9p- y del cromosoma 10q-, en estos clones polisómicos, lo que apoyaría la hipótesis de que la pérdida es un evento previo a la polisomía.

### **5.2.2. Diferencias entre adenocarcinomas y carcinomas epidermoides en la frecuencia de las alteraciones cromosómicas encontradas**

Clásicamente, los carcinomas escamosos y los adenocarcinomas de pulmón, se han considerado como dos variantes histológicas dentro del CPNM. Sin embargo, desde el punto de vista genético, hemos observado notables diferencias entre las dos variantes histológicas. Estas diferencias, estadísticamente significativas, nos hacen plantearnos a estos carcinomas como entidades genéticamente distintas, pudiendo considerarlas, a todos los efectos, como dos enfermedades distintas. En la literatura más reciente son varios los artículos que tratan de caracterizar estas diferencias utilizando fundamentalmente técnicas de aCGH (Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; Pei et al., 2001; Project & Network Genomic Medicine, 2013; Shen et al., 2009; Staaf et al., 2013; Sy et al., 2004; Tai et al., 2004; Yakut et al., 2006). Como ya se comentó en la introducción, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos por estos autores. Muchos de ellos coinciden en asociar la ganancia de 3q con la histología escamosa, y las pérdidas 3p, 4p, 4q, 5p con los adenocarcinomas (Mccaughan et al., 2010; Sriram et al., 2012; Staaf et al., 2013). Para el significado de las alteraciones descritas en el resto de regiones estudiadas y analizadas no hay consenso entre los diferentes autores revisados.

En nuestra serie, las principales diferencias las encontramos a nivel de los cromosomas 8q24, 9p21, 13q14 y 13q34. Algunos artículos han descrito la amplificación de 8q24 (C-MYC) como factor de mal pronóstico en los pacientes con adenocarcinomas de pulmón, sobre todo en pacientes en estadios iniciales, asociado a la afectación ganglionar, a altas tasas de recurrencia y menor supervivencia (Iwakawa et al., 2011; Seo et al., 2014). C-MYC es un protooncogen que actúa como factor de transcripción regulando el ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Z. Li et al., 2012; L. Zhang et al., 2010). Iwakawa et al relacionan esta ganancia de 8q24 con el subtipo adenocarcinoma. En nuestra serie hemos podido confirmar este hallazgo, encontrando que casi la totalidad de los pacientes con adenocarcinoma (50/53, 94%) ganaban esta región, mientras que en la variante escamosa solo encontramos 19 casos (40%). De los 50 pacientes que ganan 8q24 con histología de adenocarcinoma, 10 de ellos (20%) presentaban amplificación de esta región ( $\geq 6$  copias), y aunque no alcanza la significación estadística

se observa una tendencia a una menor supervivencia global de estos pacientes (mediana de 55 meses frente a 98 meses;  $P>0.05$ ). Datos semejantes a los nuestros han sido descritos por Iwakawa et al. y Seo et al., los pacientes con amplificación de este gen tenían una menor supervivencia. No hemos encontrado artículos que comenten la variante escamosa de forma aislada si no englobada en el CPNM (Kubokura et al., 2001; Rapp et al., 2009). De los 19 casos que ganaban 8q24 en la variante escamosa, tan solo 4 mostraban amplificación del gen, de nuevo, análogamente a lo que ocurría con los adenocarcinomas, sin llegar a alcanzar la significación estadística se observa que los casos que amplifican C-MYC tienden a una menor supervivencia global (mediana de 41 meses frente a 76 meses;  $P>0.05$ ).

La inactivación de CDKN2 o p16 es un hecho frecuente en CPNM, y se ha descrito fundamentalmente asociada a la delección, aunque también se la ha asociado a la metilación del promotor. Algunos de los estudios sobre las alteraciones cromosómicas en esta región no encuentran una clara asociación entre alteración en este cromosoma y el tipo histológico de CPNM (Czarnecka et al., 2013; Project & Network Genomic Medicine, 2013; Shibata et al., 2005; Shibukawa et al., 2009; Tanaka et al., 2005). Nosotros hemos observado que la región 9p se pierde en ambos subtipos, sin embargo, la pérdida se aprecia con mayor frecuencia en la histología escamosa (66% frente a 88%;  $P<0.05$ ). Previamente, Dessy et al y Kishimoto et al habían observado esta íntima relación con el carcinoma escamoso (Dessy et al., 2008; Kishimoto et al., 1995). Es probable que esta asociación con la histología escamosa se deba a la relación con el tabaco, pues la frecuencia de pérdidas de 9p está relacionada con la exposición tabáquica (Kishimoto et al., 1995; Marsit et al., 2005)

Es llamativo que, a pesar del bajo número de casos estudiados, en casi un 20% (10/53) de los adenocarcinomas hayamos observado ganancias de 9p21 frente a un solo caso (1/48) de los carcinomas escamosos, siendo este hallazgo estadísticamente significativo ( $P>0.05$ ). La polisomía/ganancia del cromosoma 9p21 ha sido descrita en CPNM sin asociación histológica alguna ni relacionada con las características clínicas y evolutivas de los pacientes (Dessy et al., 2008; Panani, Maliaga, Babanaraki, & Bellenis, 2009). Al igual que en la mayoría de los autores estudiados nuestros casos tampoco presentaron asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables clínicas estudiadas.

En cuanto al cromosoma 13, hemos observado que las dos regiones estudiadas, 13q14 y 13q34 muestran diferencias estadísticamente significativas en relación con la histología. De tal manera que la pérdida del cromosoma 13q14 es más frecuente en los carcinomas escamosos, mientras que en los

adenocarcinomas hasta un 55% de los casos no muestra alteraciones ( $P=0.001$ ). Respecto a la región 13q34 no se encontró alterada en ninguno de los adenocarcinomas, mientras que encontramos que se perdía en casi el 60% de los carcinomas escamosos ( $P>0.001$ ). Se ha descrito la pérdida del cromosoma 13q en múltiples tumores, incluido el CPNM, donde además algunos autores lo han señalado como un evento temprano en la evolución tumoral (J. U. Kang et al., 2008; Shen et al., 2009; Ignacio I Wistuba et al., 1997; Yakut et al., 2006). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto al subtipo no escamoso, para Garnis et al. se gana, mientras que para el resto de autores consultados se pierde en esta variante histológica (Dacic, 2008; Danner et al., 2011; Garnis et al., 2006a; Son et al., 2011; Staaf et al., 2013; Tai et al., 2004; Tseng, Hsieh, Hsu, & Wang, 2008). Además, Choi et al. asocian su pérdida a un peor pronóstico y un menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad (Choi et al., 2015). En cuanto a los posibles genes que alberga esta región cromosómica, destaca en 13q14 el gen supresor de tumores RB. En el CPNM se han descrito tanto su pérdida como su mutación (Das & Tan, 2013; Ding et al., 2008; Girard, Zöchbauer-Müller, Virmani, Gazdar, & Minna, 2000; Tamura et al., 1997; Umemura et al., 2014; Marileila Varella-Garcia, 2010). Recientemente, se han descrito varios genes que podrían actuar también como genes supresores de tumores en la región 13q34. De entre los posibles candidatos, destaca IGN1, que interviene en la regulación del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis, trabaja de forma cooperativa con p53 y su expresión estaría reducida en CPNM, especialmente en carcinomas escamosos (Kameyama, Huang, & Liu, 2003; Luo et al., 2011; Okano et al., 2006). Wang et al. han descrito la existencia del gen CUL4A como posible oncogen en CPNM, cuya sobre-expresión han relacionado con la progresión de la enfermedad (Yunshan Wang et al., 2014)

### **5.2.3. Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)**

Los estudios más recientes ponen de manifiesto que el CPNM no solo es un tumor heterogéneo morfológicamente si no también a nivel genético, que muestra con frecuencia cariotipos complejos, difíciles de interpretar, en los que se asocian cuatro o más alteraciones cromosómicas de tipo numérico y/o estructural (Alderton, 2014; de Bruin et al., 2014; J. Zhang et al., 2014). Algunos autores apuntan a que al grado de heterogenicidad intratumoral debería ser considerado como un marcador de mal pronóstico en sí mismo (Govindan, 2014).

A pesar de la marcada heterogenicidad genética, la mayoría de trabajos publicados comparten la hipótesis de que el evento inicial en la tumorigénesis es la monosomía/deleción del brazo corto del cromosoma 3 (Colby, Wistuba, & Gazdar, 1998; Garnis et al., 2006a; Kerr, 2001b; I I Wistuba et al., 2000; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Ignacio I Wistuba et al., 1999). Con posterioridad, se han descrito la incorporación de otras anomalías cromosómicas que ocurrirían en la célula neoplásica y que afectarían principalmente a 9p21, 17p21, 13q14 y 5p15.2, (Ahmadian et al., 1997; Colby et al., 1998; Dacic, 2008; Lantuejoul et al., 2005; L. Mao et al., 1997; I. Park et al., 1999; I I Wistuba et al., 2000; Ignacio I Wistuba & Gazdar, 2006; Ignacio I Wistuba et al., 1997, 1999; A. Zhang et al., 2000). Todos estos cambios citogenéticos no hacen más que poner de manifiesto que la inestabilidad cromosómica juega un papel esencial tanto en el desarrollo como en la progresión tumoral de los CPNM (de Bruin et al., 2014).

Algunos textos de la bibliografía más reciente han propuesto modelos hipotéticos que exponen diferentes vías de evolución clonal asociados a la progresión tumoral. Éstos modelos se fundamentan en la extrapolación de los resultados citogenéticos obtenidos por comparación de diferentes tumores, o de tumores metastásicos con sus primarios (Ding, Raphael, Chen, & Wendl, 2013; Goswami et al., 2015; Shlush & Hershkovitz, 2015; Yokota, Nishioka, Tani, & Kohno, 2003). Si bien es cierto que hay literatura que demuestra la existencia de una gran variabilidad genética a nivel intratumoral en los CPNM, los patrones de evolución clonal en CPNM han sido un tema poco estudiado en la literatura (G. T. Chung et al., 1996; de Bruin et al., 2014; Yokota et al., 2003). Además, los artículos publicados no han discriminado entre subtipos histológicos o bien, los han estudiado por separado sin llegar a compararlos (Petersen, Schlüns, Gellert, Dietel, & Petersen, 2000; J. Zhang et al., 2014).

Un requisito previo fundamental en el momento de estudiar la heterogeneidad genética a nivel intratumoral es la disponibilidad de técnicas que permitan la caracterización de todas y cada una de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el tumor mediante la identificación, de forma simultánea de dos o más alteraciones cromosómicas, en una misma célula tumoral, en ausencia de selección clonal. En el presente trabajo, utilizando técnicas de FISH sobre núcleos interfásicos en una serie amplia de carcinomas escamosos y adenocarcinomas, hemos observado que, en un porcentaje importante de los casos analizados, coexistían dos o más clones de células tumorales portadoras de diferentes alteraciones cromosómicas. Además, pudimos constatar la existencia de relaciones entre los diferentes clones, pudiendo así formular un modelo hipotético de evolución clonal para los dos principales subtipos histológicos del CPNM.

A pesar de que los patrones de alteraciones citogenéticas intratumorales que observamos fueron con frecuencia comunes a dos o más tumores, la incidencia exacta de cada uno de estos patrones era variable. Con el fin de identificar la secuencia probable de alteraciones cromosómicas acumuladas en un tumor con varios clones, asumimos que aquellas alteraciones cromosómicas que eran compartidas por todos los subclones representarían cambios iniciales; mientras que, las alteraciones citogenéticas presentes solo en algunos de los subclones tumorales aparecerían más tarde en el transcurso de la tumorigénesis. Nosotros hemos observado, de acuerdo a esta premisa, que adenocarcinomas y carcinomas escamosos muestran patrones de evolución clonal completamente diferentes. Mientras que en los adenocarcinomas existirían dos vías principales una que se caracterizaría por la delección/monosomía de 9p asociada a la pérdida de 13q, y en otra la ganancia de 8q con otros subclones asociados a cada una de ellas; en los carcinomas epidermoides se observan también dos vías principales, sin embargo en este caso, en una estarían presentes las codelecciones de 10q y 8p, mientras que en otra la ganancia de 5p sería la alteración principal; ambas con otras poblaciones subclonales asociadas.

Si bien es cierto que la pérdida de 9p es un evento temprano en la evolución del CPNM ampliamente recogido en la literatura, la asociación con los adenocarcinomas no es muy frecuente en los artículos revisados (Collisson et al., 2014; Ding et al., 2008; Tai et al., 2004). Como ya se ha comentado, para algunos autores la pérdida de 9p guarda una íntima relación con el hábito tabáquico y la histología escamosa (Kishimoto et al., 1995; Marsit et al., 2005).

Por otra parte, Kang et al (Jiun Kang, 2015) han descrito la ganancia de 5p asociada a pacientes con carcinomas epidermoides en estadio I. Lantuejoul et al ha encontrado que los niveles de mRNA de hTERT son mayores en lesiones de alto grado de displasia y carcinoma in situ en comparación con la displasia leve en la variante escamosa. Los hallazgos de estos autores y los nuestros vendrían a demostrar que la ganancia de 5p representaría un evento temprano en la evolución de los carcinomas escamosos del pulmón. En cuanto al cromosoma 8p, de nuevo Kang et al (Jiun Kang, 2015) han observado que su pérdida se produce en los primeros momentos del desarrollo del carcinoma escamoso. Aunque en el CPNM no se han descrito, las mutaciones de algunos de los genes localizados en esta región se han relacionado con la progresión de otro tipo de tumores, por ejemplo la regulación a la baja de MSRA está relacionada con el carcinoma hepatocelular o la de CLDN23 con el cáncer gástrico. La pérdida del cromosoma 8p sugiere por tanto la presencia de algún gen supresor de tumores no bien caracterizado aún en el carcinoma escamoso de pulmón.

La inactivación de PTEN, 10q23, libera de control a la vía PI3K-AKT-mTOR facilitando la proliferación celular (Davidson et al., 2010). Se ha descrito la pérdida de PTEN hasta en un 16,6% (D. Tao et al., 2016) de los carcinomas escamosos del pulmón y su alteración, aunque descrita en ambas histologías (Garnis et al., 2006b), parece estar más asociada a la variante escamosa (Cumberbatch et al., 2014; Mantripragada & Khurshid, 2013). No hemos encontrado en la literatura artículos que relacionen la pérdida de PTEN con la pérdida del cromosoma 8p como ocurre en varios casos de nuestro estudio. Es llamativo que dos de los casos de la serie muestren nulisomía de PTEN no en el clon ancestral, si no en el segundo clon en el caso de histología escamosa y en el tercer clon en el caso de adenocarcinoma. Petersen et al que también han estudiado la pérdida de PTEN en la variante escamosa de cáncer de pulmón, han relacionado la pérdida de 10q21-qter con la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis (Petersen et al., 2000). De tal modo que la pérdida de un alelo de PTEN tendría un papel en el desarrollo del carcinoma escamoso del pulmón, y la pérdida del segundo alelo conllevaría un comportamiento más agresivo una vez “establecida” la neoplasia.

Es interesante comentar que hemos observado una alta frecuencia de pérdidas de la región 22q en los adenocarcinomas (90%), bien de forma aislada o bien asociado a otros subclones minoritarios. Algunos autores han observado la pérdida de esta región genética asociada a estadios avanzados y el desarrollo de metástasis cerebrales (Shiseki et al., 1994, 1996; Yokota et al., 2003). Todos estos datos apuntan a la existencia de uno o varios genes localizados en el cromosoma 22, que perdidos en un estadio evolutivo avanzado de la enfermedad y en esta histología, confieren al tumor nuevas capacidades para el desarrollo de metástasis. Uno de los genes candidatos propuestos podría ser MIO18B, un gen de la familia de las miosinas que intervendría en el crecimiento celular sin necesidad de anclaje al estroma, y cuya inactivación se ha descrito hasta en el 50% de los cánceres de pulmón, no solo por delección, si no también por mutación o metilación del promotor (Yokota et al., 2003).

En nuestro conocimiento, éste constituye el primer intento de establecer un modelo de evolución clonal a nivel intratumoral comparando las histologías más frecuentes del CPNM.

Debido a que en el presente trabajo se estudiaron un número reducido de pacientes, que de cada tumor se estudió un fragmento representativo pero pequeño y que la técnica de FISH analiza sólo una parte de todo el genoma, no podemos excluir la posibilidad de que existan otros subclones adicionales que no hemos podido identificar.

#### **5.2.4. Impacto de las alteraciones genéticas en el comportamiento clínico de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)**

El CPNM es un problema de salud pública de máxima prioridad, es la causa de muerte por cáncer más frecuente en hombres y la segunda en mujeres. En la actualidad, el único tratamiento potencialmente curativo es la cirugía, sin embargo, la resección completa del tumor no garantiza que no se produzca recidiva. El CPNM tiene unas tasas de recaída muy altas, entre el 28-55% (Nakagawa et al., 2008; Song et al., 2014; Uramoto & Tanaka, 2014), aún cuando son diagnosticados en estadios tempranos (Rami-Porta et al., 2015).

Actualmente, la clasificación TNM es el factor pronóstico más importante y decisivo, reflejando una información global sobre el tamaño y la extensión de la infiltración tumoral, la presencia de adenopatías afectadas, su localización y número, así como de la presencia de metástasis (Mirsadraee, Oswal, Alizadeh, Caulo, & van Beek, 2012). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos y recursos empleados en investigar esta enfermedad y de los muchos trabajos que han relacionado las alteraciones genéticas con los eventos puntuales del comportamiento biológico de la misma (C. Chung & Christianson, 2014), actualmente, seguimos sin disponer de un sistema de estratificación pronóstica que combine características clínicas, patológicas y genéticas.

En nuestro estudio, tan solo hemos podido relacionar algunas de las regiones genéticas estudiadas con la supervivencia libre de enfermedad en el caso de los adenocarcinomas. Las pérdidas de los cromosomas 7p11.1 y 7q31 así como la ganancia de 8q24 han mostrado significación estadística. No hemos encontrado en la literatura artículos que relacionen las pérdidas de 7p con el adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, las ganancias en 7p se han identificado como alteraciones frecuentes, encontrando asociación con estadios más avanzados (Sholl et al., 2009). Sung et al (Sung et al., 2010) relacionaron negativamente las ganancias de esta región cromosómica con el desarrollo de recidiva en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, en nuestra serie son los pacientes que no muestran alteraciones de estas regiones los que tienen un menor tiempo libre de enfermedad. Este hecho tal vez se explique por un número de pacientes bajo en el grupo que no mostró alteraciones del cromosoma 7, además de que prácticamente todos los pacientes que mostraban alteraciones genéticas a este nivel tenían estadios bajos y/o no mostraban afectación pleural. No hemos encontrado en la literatura alteraciones de esta región concreta en asociación al adenocarcinoma de pulmón. Próxima a esta región

se encuentra EGFR, 7p11.2, cuyas mutaciones estarían presentes para algunos autores ya en la lesión preneoplásica, hiperplasia adenomatosa atípica y adenocarcinoma in situ (Liu et al., 2009; Yoshizawa et al., 2011), mientras que la amplificación sería un evento tardío en la evolución y estaría asociado a un peor pronóstico (Sholl et al., 2009; Wei et al., 2015; Yatabe et al., 2008; Yoshizawa et al., 2013). Recientemente se ha demostrado que en los pacientes que inicialmente presentan la mutación deleción del exón 19, la amplificación sería una ventaja de crecimiento con respecto a aquellos que muestran la mutación L858R (Takano et al., 2005; Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, 2015). Kang et al (Ji Kang, 2013) proponen otros múltiples locus en 7p que contendrían genes críticos relacionados con el desarrollo de esta neoplasia. De entre ellos, destaca CALM1P2 localizado también 7p11.2. Genes de la familia CALM se han descrito en relación con otro tipo de tumores, como los teratomas (Toutenhoofd et al., 1998) o el adenocarcinoma de cérvix (Stanislaus et al., 2012). VOPP1 es otro posible candidato, que normalmente se co-amplifica con EGFR y se ha descrito sobreexpresado en cáncer gástrico (Gao et al., 2015; Yuan et al., 2011). Otra región frecuentemente amplificada sería 7p15.2 donde se localizan HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXA11 and HOXA13 (Boelens et al., 2009; Garnis et al., 2006a; W. G. Jiang et al., 2015; Ji Kang, 2013; J. Wang et al., 2015). Su relación con distintas neoplasias sólidas (Marra et al., 2013), incluido el adenocarcinoma de pulmón, y hematólogicas (Alharbi, Pettengell, Pandha, & Morgan, 2013) les posiciona como importantes marcadores de mal pronóstico en la evolución de la enfermedad (J. U. Kang, 2013). Todos estos hallazgos demuestran que la región 7p es una región con gran cantidad de información genética no bien conocida y que guarda una estrecha relación con las variantes de adenocarcinoma del CPNM.

Desde el punto de vista clínico, se ha analizado la repercusión de las ganancias de 7q31 en el CPNM, donde se ha relacionado con estadios avanzados así como con la progresión de la enfermedad (Danner et al., 2011; Pei et al., 2001; Shen, Zhu, Wu, Qiu, & Shu, 2008), por lo que parece probable la presencia de oncogenes que confieran ventajas proliferativas a las células tumorales. Merece destacar que de entre los posibles candidatos que pueda haber en 7q31 destaca el gen MET. MET codifica un receptor transmembrana con actividad tirosin kinasa. La activación de MET desencadena una cascada de señalización que tiene como resultado final la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, favorece la transición epitelio mesénquima e incrementa el potencial invasivo y metastático (Birchmeier, Birchmeier, Gherardi, & Vande Woude, 2003; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Al contrario de lo que se podría esperar tras esta revisión, los pacientes que ganaron esta región cromosómica en nuestra serie tuvieron una mayor SLE, sin embargo tan solo 3 de los 33 pacientes tenían un número de copias

$\geq 6$  de la región 7q31, y por tanto amplificadas. Además, el grupo de pacientes que mostraba ganancias del cromosoma 7q31 era casi el doble que los que mostraban pérdidas ( $n=15$ ) o no tenían alterada esta región ( $n=3$ ). Curiosamente eran estos últimos casos los que menor SLE presentaron.

Ninguno de los pacientes con adenocarcinoma de nuestra serie perdió 8q24 y la práctica totalidad (50/53; 94%) ganaron esta región, confirmando lo observado en estudios preliminares. Lamentablemente, su implicación pronóstica en la SLE no ha quedado bien reflejada, debido en parte a este hecho. El gen MYC se localiza en 8q24, es un oncogen bien caracterizado relacionado con la proliferación celular, la diferenciación y el metabolismo (Coller et al., 2000). Se ha estudiado en profundidad el papel pronóstico de MYC en CPNM, algunos estudios demostrando su asociación con la progresión tumoral y un peor pronóstico. Kubokura et al (Kubokura et al., 2001) han relacionado su amplificación con la metástasis ganglionar locorregional, y Volm et al (Volm, Drings, Wodrich, & van Kaick, 1993) su sobreexpresión con el desarrollo de metástasis. La amplificación de genes de la familia MYC (MYC, MYCN y MYCL1) se ha descrito en una gran variedad de neoplasias, incluido el CPNM (Ferozan, Karhu, Kononen, Kallioniemi, & Kallioniemi, 1997; Paulson et al., 2009; Staaf et al., 2013; Westermarck, Wilhelm, Frenzel, & Henriksson, 2011). La amplificación o sobreexpresión de MYC se relaciona con un comportamiento más agresivo y resistencia al tratamiento en ambos subtipos histológicos (Marileila Varella-Garcia, 2010); sin embargo, se ha identificado en adenocarcinomas como un marcador de mal pronóstico en estadios tempranos (Iwakawa et al., 2011; Seo et al., 2014). Cuando analizamos la amplificación del gen, aunque no llegó a alcanzar la significación estadística, sí observamos que los pacientes con un número de copias de 8q24  $\geq 6$  tendían a una menor SLE (mediana de 141 meses vs 50 meses;  $P=0.356$ ).

La supervivencia a los 5 años de los pacientes con CPNM que se someten a cirugía es elevada, las tasas de mortalidad están en torno al 30% para los casos en estadio I (Guerrera et al., 2015; Osarogiagbon & Yu, 2012). A pesar de los avances acaecidos en los últimos años en el conocimiento del cáncer de pulmón, a nivel genético y molecular, no existe un panel de biomarcadores pronósticos que ayudaran a predecir la respuesta al tratamiento o la evolución de la enfermedad en CPNM. Hoy en día se conoce el impacto pronóstico de diferentes alteraciones genéticas. Dentro de ellas, los tumores que presentan mutaciones dobles de EGFR/TP53 y de RB/TP53 (The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM), 2013) se asocian a un comportamiento más agresivo, la amplificación de MYC o de EGFR se asocian a progresión de la enfermedad (Marileila Varella-Garcia, 2010) y los tumores con mayor número de copias de MET tienen una menor supervivencia global (Cappuzzo et al., 2009).

A nivel de las alteraciones genéticas la hora de predecir la supervivencia global en el presente trabajo hemos encontrado que la región 7q31 es un factor pronóstico relevante, y compartido por ambas histologías. En ambos casos los pacientes sin alteraciones a nivel de 7q31 tienen una peor SG, tal vez debido al escaso número de casos (n=4 en adenocarcinomas y n=2 en carcinomas escamosos). En el caso de los adenocarcinomas son los casos con ganancias de MET los que mayor SG tienen. Sin embargo, en los carcinomas escamosos son aquellos que tienen pérdida o monosomía de 7q31 los que mayor SG presentan. En ambos casos puede ser debido a que corresponden con la alteración más frecuente detectada a este nivel, de tal manera que los otros eventos apenas tienen pacientes.

Aunque la amplificación de MET se ha estudiado principalmente en la variante no escamosa (Casadevall et al., 2015), Cappuzzo et al. (Cappuzzo et al., 2009) tras analizar mediante FISH el número de copias de MET en 435 casos de CPNM de ambas histologías no observaron diferencias entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos, sexo o hábito tabáquico. Sus resultados concluyeron que la ganancia del número de copias representa un factor pronóstico independiente adverso en el CPNM. De los 101 pacientes analizados en el presente estudio, tan solo 3 casos tenían amplificación de la región 7q31 y todos ellos pertenecían al grupo de los adenocarcinomas. No hemos obtenido resultados estadísticamente significativos al comparar la amplificación de MET con la histología en la SG.

Es interesante destacar que de ninguno de los casos de adenocarcinomas recogidos es esta serie presenta alteración a nivel de 13q34. Es un hallazgo no recogido previamente en la literatura. Se han descrito algunos genes candidatos a oncogenes en esta localización como CUL4A (Yunshan Wang et al., 2014), RAB20 (Amillet et al., 2006), SOX1 (N. Li, Li, Li, Zhou, & Zhou, 2013) o TFDP1 (Castillo et al., 2010). En el caso de CUL4A, SOX1 y TFDP1 se han descrito en CPNM sin relacionarlos con un subtipo histológico. CUL4A es un miembro de la familia de proteínas cullin, y juega un papel fundamental en la replicación del DNA, la regulación del ciclo celular y la inestabilidad genómica (Lee & Zhou, 2012; Sugawara, 2009). Wang et al han descrito su posible papel como marcador de la respuesta a inhibidores tirosin kinasa (Yunshan Wang et al., 2014). Li et al han descrito que la metilación de SOX1 podría ser parte del mecanismo de resistencia a la terapia con cisplatino en CPNM. La amplificación de TFDP1 se ha descrito en carcinomas escamosos de esófago (Shinomiya et al., 1999), en carcinomas hepatocelulares (Yasui et al., 2002) y en CPNM (Castillo et al., 2010), es un factor de transcripción actúa formando heterodímeros con E2F1 e interacciona con RB (Helin et al., 1993). Sería interesante indagar, en futuros estudios, la relación con la histología del CPNM de esta región y la presencia de otros posibles

oncogenes, además de comparar sus alteraciones en adenocarcinomas comparando estadios bajos con otros más evolucionados, por si la alteración de 13q34 es esta variante fuera un evento tardío o en relación con el tipo de tratamiento.

Otro hallazgo interesante ha sido la identificación de focos de amplificación del cromosoma 22q en la variante escamosa y su relación con un pronóstico fatal. No hemos encontrado en la literatura ganancias del cromosoma 22 en relación al CPNM, pero sí se han descrito en carcinomas escamosos de cabeza y cuello(Matsumura et al., 2000). En esta región se encuentra el gen MAPK1, que funciona como un mediador en la transducción de señales mediadas por factores de crecimiento (Gonzalez et al., 1992). Curiosamente, la amplificación de esta región se ha observado en estadios avanzados (Speicher et al., 1995; Weber et al., 1998), sin embargo no se ha relacionado con la supervivencia. Nuestro estudio revela que la amplificación de 22q podría ser un biomarcador interesante en el pronóstico de los pacientes con carcinomas escamosos del pulmón.







# 6 CONCLUSIONES

## **6.1. En relación a la incidencia de las alteraciones cromosómicas mediante FISH en los dos principales tipos histológicos del CPNM:**

La técnica de FISH nos ha permitido definir el perfil de ganancias y pérdidas de las regiones cromosómicas estudiadas en los dos subtipos histológicos de CPNM. La principal alteración que hemos encontrado es la pérdida de 9p21, seguida de las pérdidas de 7q31 y 7p11.1 y la ganancia de 8q24.

Las diferencias entre ambos grupos se encuentran principalmente a nivel de las ganancias de 8q24, las ganancias y pérdidas de 9p21, las pérdidas de 13q34 y las pérdidas de 13q14.

## **6.2. En relación con las alteraciones genéticas que han mostrado una significación estadística con la histología o con las características clínicas y evolutivas de los pacientes:**

Las alteraciones genéticas que se asocian a las siguientes características clínico-patológicas: clasificación T, afectación ganglionar, tratamiento adyuvante y desarrollo de enfermedad metastásica, son las ganancias de 8q11, 8q24 y 17q21 y pérdidas de 7p11.1, 7q31, 9p11.1 y 9p21. Los pacientes con mayor tasa de mortalidad se asocian con las pérdidas de 9p11 y las ganancias de 7q31 y 8q24.

## **6.3. En relación con las características clínico-patológicas y las regiones cromosómicas con valor pronóstico en cuanto a la supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE):**

En el grupo de los adenocarcinomas las siguientes características patológicas: clasificación T, afectación de los ganglios linfáticos, afectación pleural, estadio TNM y el recibir tratamiento adyuvante; así como la ausencia de ganancias de la región 7q31, se asocian con una menor supervivencia. En los carcinomas escamosos, la clasificación T y el recibir tratamiento sistémico, así como las pérdidas de 7q31 y la presencia de focos de amplificación se asocian con una menor supervivencia.

Los pacientes con adenocarcinomas de pulmón con una mayor clasificación T, afectación de ganglios linfáticos y pleura, con mayor estadio y la presencia de anomalías en las regiones 7p11, 7q31 y 8q24, asocian una mayor probabilidad de recaer de forma precoz tras una cirugía con intención curativa. En los carcinomas escamosos ninguna alteración genética influye en la aparición de recidiva precoz, siendo el género masculino y una mayor gradación T los hallazgos que en este subtipo están en relación con una menor supervivencia libre de enfermedad.

#### **6.4. En relación con la heterogeneidad genética y las vías de evolución clonal en los dos principales subtipos histológicos:**

Los adenocarcinomas y carcinomas escamosos del pulmón son tumores genéticamente heterogéneos que presentan diferentes patrones de alteraciones cromosómicas, coexistiendo dos o más clones tumorales en la mayoría de los casos en cada una de las histologías. Las vías de evolución clonal asociadas a inestabilidad cromosómica son variables.

En los adenocarcinoma las dos principales vías de evolución que hemos identificado se inician con la ganancia de 8q y con las pérdidas conjuntas de 13q y 9p; y terminando, mayoritariamente, con la pérdida de 22q. En los carcinomas escamosos existen también dos vías principales, una en la que se ganan la región 5p y otra en la que coexisten las deleciones de 10q y 8p.

#### **6.5. En relación a los dos subtipos histológicos principales:**

Nuestros resultados han demostrado que genéticamente los adenocarcinomas y los carcinomas escamosos del pulmón son entidades distintas.





# 7 BIBLIOGRAFÍA

Aerts, J. G., & Hegmans, J. P. (2013). Tumor-specific cytotoxic t cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Research*, 73, 2381–2388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3932

Agarwal, M., Brahmanday, G., Chmielewski, G. W., Welsh, R. J., & Ravikrishnan, K. P. (2010). Age, tumor size, type of surgery, and gender predict survival in early stage (stage I and II) non-small cell lung cancer after surgical resection. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 68(3), 398–402. doi:10.1016/j.lungcan.2009.08.008

Ahmadian, M., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Behrens, C., Kodagoda, D. R., Saboorian, M. H., ... Gazdar, A. F. (1997). Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Research*, 57(17), 3664–3668.

Aisner, D. L., Nguyen, T. T., Paskulin, D. D., Le, A. T., Haney, J., Schulte, N., ... Varella-Garcia, M. (2013). ROS1 and ALK Fusions in Colorectal Cancer, with Evidence of Intratumoral Heterogeneity for Molecular Drivers. *Molecular Cancer Research*, 12(1), 111–118. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0479-T

Alberg, A. J., Ford, J. G., & Samet, J. M. (2007a). Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 29–55. doi:10.1378/chest.07-1347

Alberg, A. J., Ford, J. G., & Samet, J. M. (2007b). Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 29S–55S. doi:10.1378/chest.07-1347

Alderton, G. K. (2014). Tumour evolution: Clonal ancestry in lung cancer. *Nature Publishing Group*, 14(12), 763. doi:10.1038/nature13898

Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S., & Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal

hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27(5), 1000–8. doi:10.1038/leu.2012.356

Alrifai, D., Popat, S., Ahmed, M., Gonzalez, D., Nicholson, A. G., Parcq, J. du, & Benepal, T. (2013). A rare case of squamous cell carcinoma of the lung harbouring ALK and BRAF activating mutations. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 80(3), 339–40. doi:10.1016/j.lungcan.2013.02.002

Amillet, J.-M., Ferbus, D., Real, F. X., Antony, C., Muleris, M., Gress, T. M., & Goubin, G. (2006). Characterization of human Rab20 overexpressed in exocrine pancreatic carcinoma. *Human Pathology*, 37(3), 256–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16613320>

Angulo, B., Lopez-Rios, F., & Gonzalez, D. (2014). A new generation of companion diagnostics: cobas BRAF, KRAS and EGFR mutation detection tests. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 14(5), 517–24. doi:10.1586/14737159.2014.910120

Antczak, A., Migdalska-Sęk, M., Pastuszak-Lewandoska, D., Czarnecka, K., Nawrot, E., Domańska, D., ... Brzezińska, E. (2013). Significant frequency of allelic imbalance in 3p region covering RAR $\beta$  and MLH1 loci seems to be essential in molecular non-small cell lung cancer diagnosis. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 30(2), 532. doi:10.1007/s12032-013-0532-9

Asahina, H., Yamazaki, K., Kinoshita, I., Sukoh, N., Harada, M., Yokouchi, H., ... Nishimura, M. (2006). A phase II trial of gefitinib as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. *British Journal of Cancer*, 95(8), 998–1004. doi:10.1038/sj.bjc.6603393

Aviel-ronen, S., Coe, B. P., Lau, S. K., Santos, C., Zhu, C., Strumpf, D., ... Tsao, M. (2008). Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features, 105(29), 10155–10160.

Baik, S.-H., Jee, B.-K., Choi, J.-S., Yoon, H.-K., Lee, K.-H., Kim, Y.-H., & Lim, Y. (2009). DNA profiling by array comparative genomic hybridization (CGH) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and tumor tissue cell in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Molecular Biology Reports*, 36(7), 1767–78.

Basu, I., Cordovano, G., Das, I., Belbin, T. J., Guha, C., & Schramm, V. L. (2007). A transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase induces apoptosis in head and neck cancers. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21477–86. doi:10.1074/jbc.M702287200

Belinsky, S. A., Palmisano, W. A., Gilliland, F. D., Crooks, L. A., Divine, K. K., Winters, S. A., ... Crowell, R. E. (2002). Aberrant Promoter Methylation in Bronchial Epithelium and Sputum from Current and Former Smokers 1, 2370–2377.

Berker-Karaüzüm, S., Lüleci, G., Ozbilim, G., Erdoğan, A., Kuzucu, A., & Demircan, A. (1998). Cytogenetic findings in thirty lung carcinoma patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 100(2), 114–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428354>

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., & Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(12), 915–25. doi:10.1038/nrm1261

Boelens, M. C., Gustafson, A. M., Postma, D. S., Kok, K., van der Vries, G., van der Vlies, P., ... Groen, H. J. M. (2011). A chronic obstructive pulmonary disease related signature in squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 72(2), 177–183. doi:10.1016/j.lungcan.2010.08.014

Boelens, M. C., Kok, K., van der Vlies, P., van der Vries, G., Sietsma, H., Timens, W., ... van den Berg, A. (2009). Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. *Lung Cancer*, 66(3), 372–378. doi:10.1016/j.lungcan.2009.02.017

Brambilla, E., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Coll, J. L., Moro, D., Negoescu, A., & Brambilla, C. (1998). p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(7), 1609–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9676834>

Breuer, R. H., Pasic, A., Smit, E. F., van Vliet, E., Vonk Noordegraaf, A., Risse, E. J., ... Sutedja, T. G. (2005). The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(2), 537–543.

cancer.org. (n.d.). Retrieved March 3, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonnomicrocitico-celulasno/guiadetallada/cancer-de-pulmon-no-microcitico-celulas-no-pequenas-what-is-key-statistics>

Cappuzzo, F., Marchetti, A., Skokan, M., Rossi, E., Gajapathy, S., Felicioni, L., ... Varella-Garcia, M. (2009). Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(10), 1667–74. doi:10.1200/JCO.2008.19.1635

Caramori, G., Casolari, P., Cavallesco, G. N., Giuffrè, S., Adcock, I., & Papi, A. (2011). Mechanisms involved in lung cancer development in COPD. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 1030–44. doi:10.1016/j.biocel.2010.08.022

Casadevall, D., Gimeno, J., Clavé, S., Taus, Á., Pijuan, L., Arumí, M., ... Arriola, E. (2015). MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget*, 6(18), 16215–26. doi:10.18632/oncotarget.3976

Castillo, S. D., Angulo, B., Suarez-Gauthier, A., Melchor, L., Medina, P. P., Sanchez-Verde, L., ... Sanchez-Céspedes, M. (2010). Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer. *The Journal of Pathology*, 222(1), 89–98. doi:10.1002/path.2732

Cecener, G., Tunca, B., Egeli, U., Karadag, M., Vatan, O., Uzaslan, E., & Tolunay, S. (2008). Mutation analysis of the FHIT gene in bronchoscopic specimens from patients with suspected lung cancer. *Tumori*, 94(6), 845–848.

Chang, M. Y., Mentzer, S. J., Colson, Y. L., Linden, P. A., Jaklitsch, M. T., Lipsitz, S. R., & Sugarbaker, D. J. (2007). Factors predicting poor survival after resection of stage IA non-small cell lung cancer. *The*

Chansky, K., Sculier, J.-P., Crowley, J. J., Giroux, D., Van Meerbeeck, J., & Goldstraw, P. (2009). The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 4(7), 792–801. doi:10.1097/JTO.0b013e3181a7716e

Choi, J. S., Zheng, L. T., Ha, E., Lim, Y. J., Kim, Y. H., Wang, Y. P., & Lim, Y. (2006). Comparative genomic hybridization array analysis and real-time PCR reveals genomic copy number alteration for lung adenocarcinomas. *Lung*, 184, 355–362. doi:10.1007/s00408-006-0009-0

Choi, S., Kim, H. R., Sung, C. O., Kim, J., Kim, S., Ahn, S.-M., ... Jang, S. J. (2015). Genomic Alterations in the RB Pathway Indicate Prognostic Outcomes of Early-Stage Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(11), 2613–23. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0519

Christopher, S. A., Diegelman, P., Porter, C. W., & Kruger, W. D. (2002). Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Research*, 62(22), 6639–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438261>

Chung, C., & Christianson, M. (2014). Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers: a systemic review of current development, evidence, and recommendation. *Journal of Oncology Pharmacy Practice : Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 20(1), 11–28. doi:10.1177/1078155212474047

Chung, G. T., Sundaresan, V., Hasleton, P., Rudd, R., Taylor, R., & Rabbitts, P. H. (1996). Clonal evolution of lung tumors. *Cancer Research*, 56(7), 1609–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603409>

Clinical, N., Guidelines, P., & Guidelines, N. (2015). Non-Small Cell Lung.

Colby, T. V, Wistuba, I. I., & Gazdar, A. (1998). Precursors to pulmonary neoplasia. *Advances in Anatomic Pathology*, 5(4), 205–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9859753>

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., & Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3260–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., ... Sofia, H. J. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511), 543–50. doi:10.1038/nature13385

Conde, E., Angulo, B., Tang, M., Morente, M., Torres-Lanzas, J., Lopez-Encuentra, A., ... Sanchez-Cespedes, M. (2006). Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(3 Pt 1), 710–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1362

Cowan, J. M., & Francke, U. (1991). Cytogenetic analysis in melanoma and nevi. *Cancer Treatment and Research*, 54, 3–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673858>

Cumberbatch, M., Tang, X., Beran, G., Eckersley, S., Wang, X., Ellston, R. P. A., ... Womack, C. (2014). Identification of a subset of human non-small cell lung cancer patients with high PI3K $\beta$  and low PTEN expression, more prevalent in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(3), 595–603. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1638

Czarnecka, K. H., Migdalska-Sęk, M., Antczak, A., Pastuszak-Lewandoska, D., Kordiak, J., Nawrot, E., ... Brzeziańska, E. B. (2013). Allelic imbalance in 1p, 7q, 9p, 11p, 12q and 16q regions in non-small cell lung carcinoma and its clinical association: a pilot study. *Molecular Biology Reports*, 40(12), 6671–84.

D'Addario, G., Pintilie, M., Leighl, N. B., Feld, R., Cerny, T., & Shepherd, F. A. (2005). Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(13), 2926–36. doi:10.1200/JCO.2005.03.045

Dacic, S. (2008). Pulmonary preneoplasia. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 132(July), 1073–1078. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[1073:PP]2.0.CO;2

Danner, B. C., Hellms, T., Jung, K., Gunawan, B., Didilis, V., Füzesi, L., ... Non-small, B. (2011). Prognostic Value of Chromosomal Imbalances in Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Lung. *ATS*, 92(3), 1038–1043. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.04.052

Das, K., & Tan, P. (2013). Molecular cytogenetics: Recent developments and applications in cancer. *Clinical Genetics*, 84(4), 315–325. doi:10.1111/cge.12229

Davidson, L., Maccario, H., Perera, N. M., Yang, X., Spinelli, L., Tibarewal, P., ... Leslie, N. R. (2010). Suppression of cellular proliferation and invasion by the concerted lipid and protein phosphatase activities of PTEN. *Oncogene*, 29(5), 687–97. doi:10.1038/onc.2009.384

Davies, K. D., & Doebele, R. C. (2013). Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(15), 4040–5. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2851

de Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., ... Swanton, C. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*, 346(6206), 251–256. doi:10.1126/science.1253462

Desai, A., Menon, S. P., & Dy, G. K. (2016). Alterations in genes other than EGFR/ALK/ROS1 in non-small cell lung cancer: trials and treatment options. *Cancer Biology & Medicine*, 13(1), 77–86.

Dessy, E., Rossi, E., Berenzi, A., Tironi, A., Benetti, A., & Grigolato, P. (2008). Chromosome 9 instability and alterations of p16 gene in squamous cell carcinoma of the lung and in adjacent normal bronchi: FISH and immunohistochemical study. *Histopathology*, 52(4), 475–482. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.02969.x

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., ... Wilson, R. K. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455(7216), 1069–75. doi:10.1038/nature07423

Ding, L., Raphael, B. J., Chen, F., & Wendl, M. C. (2013). Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Letters*, 340(2), 212–9. doi:10.1016/j.canlet.2012.12.028

DOLL, R., & HILL, A. B. (1954). The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. *British Medical Journal*, 1(4877), 1451–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2085438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dutt, A., Ramos, A. H., Hammerman, P. S., Mermel, C., Cho, J., Sharifnia, T., ... Meyerson, M. (2011). Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PloS One*, 6(6), e20351. doi:10.1371/journal.pone.0020351

Erdel, M., Peter, W., Spiess, E., Trefz, G., & Ebert, W. (1990). Karyotypic characterization of established cell lines derived from a squamous cell carcinoma and an adenocarcinoma of human lung cancers. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 49(2), 185–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2208054>

Felip, E., Concha, Á., de Castro, J., Gómez-Román, J., Garrido, P., Ramírez, J., ... López-Ríos, F. (2015). Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clinical & Translational Oncology*: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(6), 1374–403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027

Flacco, A., Ludovini, V., Bianconi, F., Ragusa, M., Bellezza, G., Tofanetti, F. R., ... Crinò, L. (2015a). MYC and human telomerase gene (TERC) copy number gain in early-stage non-small cell lung cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 38(2), 152–8. doi:10.1097/COC.0000000000000012

Flacco, A., Ludovini, V., Bianconi, F., Ragusa, M., Bellezza, G., Tofanetti, F. R., ... Crinò, L. (2015b). MYC and human telomerase gene (TERC) copy number gain in early-stage non-small cell lung cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 38(2), 152–8. doi:10.1097/COC.0000000000000012

Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., & Kallioniemi, O. P. (1997). Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends in Genetics : TIG*, 13(10), 405–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351342>

Foster, N. A., Banerjee, A. K., Xian, J., Roberts, I., Pezzella, F., Coleman, N., ... Rabbitts, P. H. (2005). Somatic genetic changes accompanying lung tumor development. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 44(1), 65–75. doi:10.1002/gcc.20223

Furge, K. A., Zhang, Y. W., & Vande Woude, G. F. (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19(49), 5582–9. doi:10.1038/sj.onc.1203859

Futreal, P. A. (2007). Backseat drivers take the wheel. *Cancer Cell*, 12(6), 493–4. doi:10.1016/j.ccr.2007.11.020

Gao, C., Pang, M., Zhou, Z., Long, S., Dong, D., Yang, J., ... Li, L. (2015). Epidermal growth factor receptor-coamplified and overexpressed protein (VOPP1) is a putative oncogene in gastric cancer. *Clinical and Experimental Medicine*, 15(4), 469–75. doi:10.1007/s10238-014-0320-7

Garnis, C., Lockwood, W. W., Vucic, E., Ge, Y., Girard, L., Minna, J. D., ... Lam, W. L. (2006a). High resolution analysis of non-small cell lung cancer cell lines by whole genome tiling path array CGH. *International Journal of Cancer*, 118, 1556–1564. doi:10.1002/ijc.21491

Garnis, C., Lockwood, W. W., Vucic, E., Ge, Y., Girard, L., Minna, J. D., ... Lam, W. L. (2006b). High resolution analysis of non-small cell lung cancer cell lines by whole genome tiling path array CGH. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 118(6), 1556–64. doi:10.1002/ijc.21491

Gazdar, A. F., & Brambilla, E. (2012). Preneoplasia of lung cancer. In *Translational Pathology of Early Cancer* (Vol. 9, pp. 385–396). doi:10.3233/978-1-61499-024-6-385

Ge, L., & Shi, R. (2015). Progress of EGFR-TKI and ALK/ROS1 inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), 10330–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4565207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Girard, L., Zöchbauer-Müller, S., Virmani, A. K., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (2000). Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Research*, 60(17), 4894–906. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987304>

Globocan 2012 - Home. (n.d.). Retrieved March 3, 2015, from <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Go, H., Jeon, Y. K., Park, H. J., Sung, S.-W., Seo, J.-W., & Chung, D. H. (2010). High MET Gene Copy Number Leads to Shorter Survival in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(3), 305–313. doi:10.1097/JTO.0b013e3181ce3d1d

Go, H., Kim, D.-W., Kim, D., Keam, B., Kim, T. M., Lee, S.-H., ... Chung, D. H. (2013). Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*,

Gonzalez, F. A., Raden, D. L., Rigby, M. R., & Davis, R. J. (1992). Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Letters*, 304(2-3), 170–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319925>

Goodgame, B., Viswanathan, A., Zoole, J., Gao, F., Miller, C. R., Subramanian, J., ... Govindan, R. (2009). Risk of recurrence of resected stage I non-small cell lung cancer in elderly patients as compared with younger patients. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 4(11), 1370–4. doi:10.1097/JTO.0b013e3181b6bc1b

Goswami, R. S., Patel, K. P., Singh, R. R., Meric-Bernstam, F., Kopetz, E. S., Subbiah, V., ... Routbort, M. J. (2015). Hotspot mutation panel testing reveals clonal evolution in a study of 265 paired primary and metastatic tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(11), 2644–51. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2391

Govindan, R. (2014). Cancer. Attack of the clones. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6206), 169–70. doi:10.1126/science.1259926

Guerrera, F., Errico, L., Evangelista, A., Filosso, P. L., Ruffini, E., Lisi, E., ... Oliaro, A. (2015). Exploring Stage I non-small-cell lung cancer: development of a prognostic model predicting 5-year survival after surgical resection†. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 47(6), 1037–43. doi:10.1093/ejcts/ezu410

Hecht, S. S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194–1210. doi:10.1093/jnci/91.14.1194

Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 131(12), 2724–32. doi:10.1002/ijc.27816

Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C., & Harlow, E. (1993).

Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes & Development*, 7(10), 1850–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8405995>

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., ... Aaltonen, L. A. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391(6663), 184–7. doi:10.1038/34432

Hernández-García, I., Sáenz-González, M. C., & González-Celador, R. (n.d.). Mortalidad atribuible al consumo de tabaco en España en el año 2006. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 33(1), 23–33. Retrieved from [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Hernández-Hernández, J. R., Heras-Gómez, F., Cordovilla-Pérez, M. R., Antolín-García, T., & Bollo De Miguel, E. (2010). [Incidence of bronchopulmonary cancer in Castilla y Leon and Cantabria in the year 2007. A study by the Castilla y Leon and Cantabria Respiratory Diseases Society (SOCALPAR)]. *Archivos de bronconeumología*, 46(1), 7–14. doi:10.1016/j.arbres.2009.09.010

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., ... Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, 18(3), 813–22. doi:10.1038/sj.onc.1202367

Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., ... Brennan, P. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, 452(7187), 633–7. doi:10.1038/nature06885

Hustinx, S. R., Hruban, R. H., Leoni, L. M., Iacobuzio-Donahue, C., Cameron, J. L., Yeo, C. J., ... Maitra, A. (2005). Homozygous deletion of the MTAP gene in invasive adenocarcinoma of the pancreas and in periampullary cancer: a potential new target for therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 4(1), 83–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15662124>

Inoue, A., Suzuki, T., Fukuhara, T., Maemondo, M., Kimura, Y., Morikawa, N., ... Nukiwa, T. (2006).

Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(21), 3340–6. doi:10.1200/JCO.2005.05.4692

Instituto De Salud Carlos III, C. N. D. E. (2004). Plan integral del cáncer : situación del cáncer en España. Retrieved from <http://www.msps.es/ciudadanos/enfLesiones/enfNoTransmisibles/docs/situacionCancer.pdf>

Iwakawa, R., Kohno, T., Kato, M., Shiraishi, K., Tsuta, K., Noguchi, M., ... Yokota, J. (2011). MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clinical Cancer Research*, 17, 1481–1489. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2484

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 71–96. doi:10.3322/CA.2007.0010

Ji, H., Ramsey, M. R., Hayes, D. N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., ... Wong, K.-K. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*, 448(7155), 807–10. doi:10.1038/nature06030

Jiang, L., Liang, W., Shen, J., Chen, X., Shi, X., He, J., ... He, J. (2015). The impact of visceral pleural invasion in node-negative non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chest*, 148(4), 903–11. doi:10.1378/chest.14-2765

Jiang, T., Gao, G., Fan, G., Li, M., & Zhou, C. (2015). FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer*, 87, 1–7. doi:10.1016/j.lungcan.2014.11.009

Jiang, W. G., Ye, L., Ruge, F., Sun, P.-H., Sanders, A. J., Ji, K., ... Mason, M. D. (2015). Expression of Sonic Hedgehog (SHH) in human lung cancer and the impact of YangZheng Xiaoji on SHH-mediated biological function of lung cancer cells and tumor growth. *Anticancer Research*, 35(3), 1321–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750281>

Kamatani, N., Yu, A. L., & Carson, D. A. (1982). Deficiency of methylthioadenosine phosphorylase in human leukemic cells in vivo. *Blood*, 60(6), 1387–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6814551>

Kameyama, K., Huang, C., & Liu, D. (2003). Reduced ING1b Gene Expression Plays an Important Role in Carcinogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Reduced ING1b Gene Expression Plays an Important Role in Carcinogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients, 9, 4926–4934.

Kang, J. (2013). Characterization of amplification patterns and target genes on the short arm of chromosome 7 in early-stage lung adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 2(i), 1373–1378. doi:10.3892/mmr.2013.1686

Kang, J. (2015). Genomic alterations on 8p21-p23 are the most frequent genetic events in stage I squamous cell carcinoma of the lung. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(2), 345–350. doi:10.3892/etm.2014.2123

Kang, J. U. (2013). Characterization of amplification patterns and target genes on the short arm of chromosome 7 in early-stage lung adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 8(5), 1373–8. doi:10.3892/mmr.2013.1686

Kang, J. U., Koo, S. H., Kwon, K. C., Park, J. W., & Kim, J. M. (2008). Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 182(1), 1–11. doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.12.004

Kang, J. U., Koo, S. H., Kwon, K. C., Park, J. W., & Kim, J. M. (2009). Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. *BMC Cancer*, 9, 237. doi:10.1186/1471-2407-9-237

Karachaliou, N., Mayo, C., Costa, C., Magrí, I., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., & Rosell, R. (2013). KRAS mutations in lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 14(3), 205–14. doi:10.1016/j.clcc.2012.09.007

Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., & Meeker, A. K. (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(2), 254–62. doi:10.1309/91PY0RBD9W8Y5GNX

Kerr, K. M. (2001a). Pulmonary preinvasive neoplasia. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 257–271. doi:10.1136/jcp.54.4.257

Kerr, K. M. (2001b). Pulmonary preinvasive neoplasia. *Journal of Clinical Pathology*, 54(4), 257–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1731391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Kerr, K. M., Bubendorf, L., Edelman, M. J., Marchetti, A., Mok, T., Novello, S., ... Felip, E. (2014). Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(9), 1681–90. doi:10.1093/annonc/mdu145

Kim, J., Kim, M. A., Min, S. Y., Jee, C. Do, Lee, H. E., & Kim, W. H. (2011). Downregulation of methylthioadenosin phosphorylase by homozygous deletion in gastric carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 50(6), 421–33. doi:10.1002/gcc.20867

Kirovski, G., Stevens, A. P., Czech, B., Dettmer, K., Weiss, T. S., Wild, P., ... Hellerbrand, C. (2011). Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA). *The American Journal of Pathology*, 178(3), 1145–52. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.059

Kishimoto, Y., Sugio, K., Mitsudomi, T., Oyama, T., Virmani, A. K., McIntire, D. D., & Gazdar, A. F. (1995). Frequent loss of the short arm of chromosome 9 in resected non-small-cell lung cancers from Japanese patients and its association with squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 121(5), 291–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768967>

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärnlund, M., Schraml, P., Leighton, S., ... Kallioniemi,

O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, 4(7), 844–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662379>

Kubokura, H., Tenjin, T., Akiyama, H., Koizumi, K., Nishimura, H., Yamamoto, M., & Tanaka, S. (2001). Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery : Official Journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*, 7(4), 197–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578259>

Langer, C. J. (2014). Emerging Immunotherapies in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): The Role of Immune Checkpoint Inhibitors. *American Journal of Clinical Oncology*, 00(00), 1–9. doi:10.1097/COC.0000000000000059

Lantuéjoul, S., Salon, C., Soria, J. C., & Brambilla, E. (2007). Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *International Journal of Cancer*, 120(9), 1835–1841. doi:10.1002/ijc.22473

Lantuejoul, S., Soria, J. C., Morat, L., Lorimier, P., Moro-Sibilot, D., Sabatier, L., ... Brambilla, E. (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clinical Cancer Research*, 11(5), 2074–2082. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1376

Lee, J., & Zhou, P. (2012). Pathogenic Role of the CRL4 Ubiquitin Ligase in Human Disease. *Frontiers in Oncology*, 2, 21. doi:10.3389/fonc.2012.00021

Li, N., Li, X., Li, S., Zhou, S., & Zhou, Q. (2013). Cisplatin-induced downregulation of SOX1 increases drug resistance by activating autophagy in non-small cell lung cancer cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(2), 187–90. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.065

Li, T., Kung, H.-J., Mack, P. C., & Gandara, D. R. (2013). Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(8), 1039–49. doi:10.1200/JCO.2012.45.3753

Li, Z., Owonikoko, T. K., Sun, S.-Y., Ramalingam, S. S., Doetsch, P. W., Xiao, Z.-Q., ... Deng, X. (2012). c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 14(12), 1190–202. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3540944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Beasley, M. B., Chitale, D. A., Dacic, S., Giaccone, G., ... College of American Pathologists International Association for the Study of Lung Cancer and Association for Molecular Pathology. (2013). Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 15(4), 415–53. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.03.001

Liu, H., Li, Y., Chen, G., Wang, J., Li, Y., Wang, Y., ... Zhou, Q. (2009). [Detection and Its Clinical Significance of EGFR Gene Mutation and Gene Amplification in 187 Patients with Non-small Cell Lung Cancer.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer*, 12(12), 1219–28. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.12.01

López-Abente, G., Pollán, M., Aragonés, N., Gómez, B. P., Barrera, V. H., Lope, V., & Suárez, B. (2008). Situación del cáncer en España: incidencia. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 27, 165–173. doi:10.4321/S1137-66272004000300001

Lopez-Beltran, A., Ordóñez, J. L., Otero, A. P., Blanca, A., Sevillano, V., Sanchez-Carbayo, M., ... de Alava, E. (2010). Cyclin D3 gene amplification in bladder carcinoma in situ. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 457(5), 555–61. doi:10.1007/s00428-010-0969-6

Luo, Z.-G., Tang, H., Li, B., Zhu, Z., Ni, C.-R., & Zhu, M.-H. (2011). Genetic alterations of tumor suppressor ING1 in human non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 25, 1073–1081. doi:10.3892/or.2011.1172

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., ... Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness

of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–39. doi:10.1056/NEJMoa040938

Ma, P. C., Jagadeeswaran, R., Jagadeesh, S., Tretiakova, M. S., Nallasura, V., Fox, E. A., ... Salgia, R. (2005). Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 65(4), 1479–88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2650

Mantripragada, K., & Khurshid, H. (2013). Targeting genomic alterations in squamous cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 195. doi:10.3389/fonc.2013.00195

Mao, C., Qiu, L.-X., Liao, R.-Y., Du, F.-B., Ding, H., Yang, W.-C., ... Chen, Q. (2010). KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 69(3), 272–8. doi:10.1016/j.lungcan.2009.11.020

Mao, L., Lee, J. S., Kurie, M., Fan, Y. H., Lippman, M., Lee, J. J., ... Hong, W. K. (1997). Clonal Genetic Alterations in the Lungs of Current and Former Smokers, 89(12), 857–862.

Maroun, C. R., & Rowlands, T. (2014). The Met receptor tyrosine kinase: a key player in oncogenesis and drug resistance. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(3), 316–38. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.014

Marra, L., Cantile, M., Scognamiglio, G., Perdonà, S., La Mantia, E., Cerrone, M., ... Franco, R. (2013). Deregulation of HOXB13 expression in urinary bladder cancer progression. *Current Medicinal Chemistry*, 20(6), 833–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276138>

Marsit, C. J., Wiencke, J. K., Nelson, H. H., Kim, D.-H., Hinds, P. W., Aldape, K., & Kelsey, K. T. (2005). Alterations of 9p in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: association with smoking, TP53, and survival. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 162(2), 115–21. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.04.001

Mascaux, C., Iannino, N., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., ... Sculier, J.-P. (2005). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 92(1), 131–9. doi:10.1038/sj.bjc.6602258

Mason, I. (2007). Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(8), 583–96. doi:10.1038/nrn2189

Massion, P. P., Taflan, P. M., Jamshedur Rahman, S. M., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M. E., ... Gonzalez, A. L. (2003). Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Research*, 63(21), 7113–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612504>

Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., ... Yokota, J. (2007). Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, 26(40), 5911–5918. doi:10.1038/sj.onc.1210418

Matsumura, K., Iritani, A., Enomoto, S., Torikata, C., Matsuyama, S., Kurita, A., ... Tsuchida, N. (2000). Defining a common region of DNA amplification at 22q11.2-12 in head and neck squamous cell carcinomas by quantitative FISH analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 29(3), 207–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992295>

Mccaughan, F., Pole, J. C. M., Bankier, A. T., Konfortov, B. A., Carroll, B., Falzon, M., ... Rabbitts, P. H. (2010). Progressive 3q Amplification Consistently Targets SOX2 in Preinvasive Squamous Lung Cancer, 182, 83–91. doi:10.1164/rccm.201001-0005OC

Mendes-da-Silva, P., Moreira, a, Duro-da-Costa, J., Matias, D., & Monteiro, C. (2000). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. *Molecular Pathology : MP*, 53(4), 184–187.

Mirsadraee, S., Oswal, D., Alizadeh, Y., Caulo, A., & van Beek, E. (2012). The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World Journal of Radiology*,

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. a. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), 584–594. doi:10.4065/83.5.584

Montero, C., Rosales, M., Otero, I., Blanco, M., Rodríguez, G., Peterga, S., ... Vereá, H. (2003). Cáncer de pulmón en el Área Sanitaria de A Coruña: incidencia, abordaje clínico y supervivencia. *Archivos de Bronconeumología*, 39(05), 209–216. Retrieved from <http://www.archbronconeumol.org/es/cancer-pulmon-el-rea-sanitaria/articulo/13047334/>

Morgensztern, D., Campo, M. J., Dahlberg, S. E., Doebele, R. C., Garon, E., Gerber, D. E., ... Govindan, R. (2015). Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(1 Suppl 1), S1–S63. doi:10.1097/JTO.0000000000000405

Nakagawa, T., Okumura, N., Ohata, K., Igai, H., Matsuoka, T., & Kameyama, K. (2008). Postrecurrence survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 34(3), 499–504. doi:10.1016/j.ejcts.2008.05.016

Nakamura, H., Saji, H., Idiris, A., Kawasaki, N., Hosaka, M., Ogata, A., ... Kato, H. (2003). Chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(6), 2294–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796398>

Nakanishi, H., Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Tsuta, K., ... Yokota, J. (2009). Whole genome comparison of allelic imbalance between noninvasive and invasive small-sized lung adenocarcinomas. *Cancer Research*, 69(4), 1615–1623. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3218

Nakanishi, K., Kawai, T., Kumaki, F., Hirotsu, S., Mukai, M., & Ikeda, E. (2002). Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Human Pathology*, 33(7), 697–702. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196920>

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. (2016). Non-Small Cell Lung.

Nelson, M. A., Wymer, J., & Clements, N. (1996). Detection of K-ras gene mutations in non-neoplastic lung tissue and lung cancers. *Cancer Letters*, 103(1), 115–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616804>

Nirschl, C. J., & Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(18), 4917–24. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1972

Nishizaki, M., Sasaki, J.-I., Fang, B., Atkinson, E. N., Minna, J. D., Roth, J. A., & Ji, L. (2004). Synergistic tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research*, 64(16), 5745–52. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0195

Nymark, P., Wikman, H., Ruosaari, S., Hollmén, J., Vanhala, E., Karjalainen, A., ... Knuutila, S. (2006). Identification of specific gene copy number changes in asbestos-related lung cancer. *Cancer Research*, 66(11), 5737–5743. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0199

Oberije, C., De Ruyscher, D., Houben, R., van de Heuvel, M., Uytendaele, W., Deasy, J. O., ... Lambin, P. (2015). A Validated Prediction Model for Overall Survival From Stage III Non-Small Cell Lung Cancer: Toward Survival Prediction for Individual Patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 92(4), 935–44. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.02.048

Okano, T., Gemma, A., Hosoya, Y., Hosomi, Y., Nara, M., Kokubo, Y., ... Kudoh, S. (2006). Alterations

in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncology Reports*, 15(3), 545–549.

Osarogiagbon, R. U., & Yu, X. (2012). Mediastinal lymph node examination and survival in resected early-stage non-small-cell lung cancer in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(12), 1798–806. doi:10.1097/JTO.0b013e31827457db

Ozkara, H. A., Ozkara, S., Topçu, S., & Criss, W. E. Amplification of the c-myc oncogene in non-small cell lung cancer. *Tumori*, 85(6), 508–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774575>

Panani, A. D., Maliaga, K., Babanaraki, A., & Bellenis, I. (2009). Numerical abnormalities of chromosome 9 and p16CDKN2A gene deletion detected by FISH in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 29(11), 4483–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032395>

Pao, W., & Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet. Oncology*, 12(2), 175–80. doi:10.1016/S1470-2045(10)70087-5

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 252–64. doi:10.1038/nrc3239

Park, I., Wistuba, I. I., Maitra, A., Milchgrub, S., Virmani, A. K., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Multiple Clonal Abnormalities in the Bronchial Epithelium of Patients With Lung Cancer, 91(21), 1863–1868.

Park, S., Choi, Y.-L., Sung, C. O., An, J., Seo, J., Ahn, M.-J., ... Han, J. (2012). High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histology and Histopathology*, 27(2), 197–207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22207554>

Paulson, K. G., Lemos, B. D., Feng, B., Jaimes, N., Peñas, P. F., Bi, X., ... Nghiem, P. (2009). Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *The*

Pei, J., Balsara, B. R., Li, W., Litwin, S., Gabrielson, E., Feder, M., ... Testa, J. R. (2001). Genomic Imbalances in Human Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas, 287(May), 282–287.

Pekarsky, Y., Zanesi, N., Palamarchuk, A., Huebner, K., & Croce, C. M. (2002). FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *The Lancet. Oncology*, 3(12), 748–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473516>

Petersen, S., Schlüns, K., Gellert, K., Dietel, M., & Petersen, I. (2000). Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung, 82, 65–73.

Pfister, D. G., Johnson, D. H., Azzoli, C. G., Sause, W., Smith, T. J., Baker, S., ... Somerfield, M. R. (2004). American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(2), 330–53. doi:10.1200/JCO.2004.09.053

Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., ... Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, 77(2), 261–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513258>

Profile, C. M., Trends, A. C. M., & Incidence, C. (2014). Spain.

Project, T. C. L. C. G., & Network Genomic Medicine. (2013). A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Sci Transl Med*, 5(209), 209ra153. doi:10.1126/scitranslmed.3006802

Qian, J., & Massion, P. P. (2008). Role of chromosome 3q amplification in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 3(3), 212–5. doi:10.1097/JTO.0b013e3181663544

Rami-Porta, R., Bolejack, V., Crowley, J., Ball, D., Kim, J., Lyons, G., ... IASLC Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards and Participating Institutions. (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(7), 990–1003. doi:10.1097/JTO.0000000000000559

Rapp, U. R., Korn, C., Ceteci, F., Karreman, C., Luetkenhaus, K., Serafin, V., ... Potapenko, T. (2009). MYC is a metastasis gene for non-small-cell lung cancer. *PloS One*, 4(6), e6029. doi:10.1371/journal.pone.0006029

Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., ... Comb, M. J. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*, 131(6), 1190–203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025

Riquet, M., Mordant, P., Pricopi, C., Legras, A., Foucault, C., Dujon, A., ... Le pimpec-barthes, F. (2014). A review of 250 ten-year survivors after pneumonectomy for non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 45(5), 876–881. doi:10.1093/ejcts/ezt494

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., ... Taron, M. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(10), 958–67. doi:10.1056/NEJMoa0904554

Rossi, G., Mengoli, M. C., Cavazza, a., Nicoli, D., Barbareschi, M., Cantaloni, C., ... Pelosi, G. (2014). Large cell carcinoma of the lung: Clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Archiv*, 464, 61–68. doi:10.1007/s00428-013-1501-6

Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I., & Dmitrovsky, E. (1995). Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Research*, 55(6), 1365–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882337>

Sakamoto, H., Shimizu, J., Horio, Y., Ueda, R., Takahashi, T., Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2007). Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas, (May), 287–294. doi:10.1002/path

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., ... Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5670), 554. doi:10.1126/science.1096502

Sanchez-Carbayo, M. (2011). Antibody microarrays as tools for biomarker discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 785, 159–82. doi:10.1007/978-1-61779-286-1\_11

Sanchez-Cespedes, M. (2007). A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz–Jeghers syndrome. *Oncogene*, 26(57), 7825–7832. doi:10.1038/sj.onc.1210594

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J. M., ... Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Research*, 62(13), 3659–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097271>

Santos-Martínez, M. J., Curull, V., Blanco, M. L., Macià, F., Mojal, S., Vila, J., & Broquetas, J. M. (2005). Características del cáncer de pulmón en un hospital universitario. Cambios epidemiológicos e histológicos en relación con una serie histórica. *Archivos de Bronconeumología*, 41(6), 307–312. doi:10.1157/13075998

Scott, W. J., Howington, J., Feigenberg, S., Movsas, B., & Pisters, K. (2007). Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 234S–242S. doi:10.1378/chest.07-1378

Scrima, M., de Marco, C., Fabiani, F., Franco, R., Pirozzi, G., Rocco, G., ... Viglietto, G. (2012). Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): New insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE*, 7(2). doi:10.1371/journal.pone.0030427

Section, S. (2008). *Global Cancer. Society*, (700), 1–57. doi:10.1002/ijc.27711

Seo, A. N., Yang, J. M., Kim, H., Jheon, S., Kim, K., Lee, C. T., ... Paik, J. H. (2014). Clinicopathologic and prognostic significance of c-MYC copy number gain in lung adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 110(11), 2688–2699. doi:10.1038/bjc.2014.218

Sequist, L. V, Martins, R. G., Spigel, D., Grunberg, S. M., Spira, A., Jänne, P. A., ... Lynch, T. J. (2008). First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(15), 2442–9. doi:10.1200/JCO.2007.14.8494

Sergina, N. V, Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., & Moasser, M. M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*, 445(7126), 437–41. doi:10.1038/nature05474

Shaper, a. G., Wannamethee, S. G., & Walker, M. (2003). Pipe and cigar smoking and major cardiovascular events, cancer incidence and all-cause mortality in middle-aged British men. *International Journal of Epidemiology*, 32, 802–808. doi:10.1093/ije/dyg206

Shen, H., Gao, W., Wu, Y., Qiu, H., & Shu, Y. (2009). Multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization reveal molecular events in lung adenocarcinomas and squamous cell lung carcinomas. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(6), 396–403. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.010

Shen, H., Zhu, Y., Wu, Y.-J., Qiu, H.-R., & Shu, Y.-Q. (2008). Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 181(2), 100–7. doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.11.012

Shepherd, F. A., Domerg, C., Hainaut, P., Jänne, P. A., Pignon, J.-P., Graziano, S., ... Tsao, M.-S. (2013). Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(17), 2173–

Shibata, T., Uryu, S., Kokubu, A., Hosoda, F., Ohki, M., Sakiyama, T., ... Hirohashi, S. (2005). Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(17), 6177–85. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0293

Shibukawa, K., Miyokawa, N., Tokusashi, Y., Sasaki, T., Osanai, S., & Ohsaki, Y. (2009). High incidence of chromosomal abnormalities at 1p36 and 9p21 in early-stage central type squamous cell carcinoma and squamous dysplasia of bronchus detected by autofluorescence bronchoscopy. *Oncology Reports*, 22(1), 81–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513508>

Shinomiya, T., Mori, T., Ariyama, Y., Sakabe, T., Fukuda, Y., Murakami, Y., ... Inazawa, J. (1999). Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DPI gene in the 13q34 amplicon. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24(4), 337–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092132>

Shiseki, M., Kohno, T., Adachi, J., Okazaki, T., Otsuka, T., Mizoguchi, H., ... Yokota, J. (1996). Comparative allelotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 17(2), 71–7. doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199610)17:2<71::AID-GCC1>3.0.CO;2-Y

Shiseki, M., Kohno, T., Nishikawa, R., Sameshima, Y., Mizoguchi, H., & Yokota, J. (1994). Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 54(21), 5643–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923210>

Shlush, L. I., & HersHKovitz, D. (2015). Clonal evolution models of tumor heterogeneity. *American Society of Clinical Oncology Educational Book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, e662–5. doi:10.14694/EdBook\_AM.2015.35.e662

Sholl, L. M., Yeap, B. Y., Iafrate, A. J., Holmes-Tisch, A. J., Chou, Y.-P., Wu, M.-T., ... Chirieac, L. R. (2009). Lung adenocarcinoma with EGFR amplification has distinct clinicopathologic and molecular features in

never-smokers. *Cancer Research*, 69(21), 8341–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2477

Slebos, R. J., Hruban, R. H., Dalesio, O., Mooi, W. J., Offerhaus, G. J., & Rodenhuis, S. (1991). Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(14), 1024–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072410>

Sociedad Española de Oncología Médica. (2014). Las Cifras del Cáncer en España 2014. Retrieved from <http://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104582-el-cancer-en-espana-2014>

Soh, J., Toyooka, S., Ichihara, S., & Asano, H. (2008). Sequential Molecular Changes during Multistage Pathogenesis of Small Peripheral Adenocarcinomas of the Lung, 3(4), 340–347.

Son, J. W., Jeong, K. J., Jean, W.-S., Park, S. Y., Jheon, S., Cho, H. M., ... Kang, J. (2011). Genome-wide combination profiling of DNA copy number and methylation for deciphering biomarkers in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Letters*, 311(1), 29–37. doi:10.1016/j.canlet.2011.06.021

Song, I. H., Yeom, S. W., Heo, S., Choi, W. S., Yang, H. C., Jheon, S., ... Cho, S. (2014). Prognostic factors for post-recurrence survival in patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 45(2), 262–267. doi:10.1093/ejcts/ezt333

Sozzi, G., Veronese, M. L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M. G., Inoue, H., ... Croce, C. M. (1996). The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85(1), 17–26. doi:10.1016/S0092-8674(00)81078-8

Speicher, M. R., Howe, C., Crotty, P., du Manoir, S., Costa, J., & Ward, D. C. (1995). Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Research*, 55(5), 1010–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7866983>

Sriram, K. B., Larsen, J. E., Francis, S. M. S., Wright, C. M., Belinda, E., Duhig, E. E., ... Fong, K. M. (2012). Array-Comparative Genomic Hybridization Reveals Loss of SOCS6 Is Associated with Poor Prognosis in

Staaf, J., Isaksson, S., Karlsson, A., Jönsson, M., Johansson, L., Jönsson, P., ... Planck, M. (2013). Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in human lung carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 132(9), 2020–31. doi:10.1002/ijc.27879

Stanislaus, A., Bakhtiar, A., Salleh, D., Tiash, S., Fatemian, T., Hossain, S., ... Chowdhury, E. H. (2012). Knockdown of PLC-gamma-2 and calmodulin 1 genes sensitizes human cervical adenocarcinoma cells to doxorubicin and paclitaxel. *Cancer Cell International*, 12(1), 30. doi:10.1186/1475-2867-12-30

Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., ... Stratton, M. R. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*, 431(7008), 525–6. doi:10.1038/431525b

Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(1), djt356. doi:10.1093/jnci/djt356

Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–24. doi:10.1038/nature07943

Su, C.-Y., Chang, Y.-C., Chan, Y.-C., Lin, T.-C., Huang, M.-S., Yang, C.-J., & Hsiao, M. (2014). MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 40(9), 1143–50. doi:10.1016/j.ejso.2014.04.017

Sugasawa, K. (2009). The CUL4 enigma: culling DNA repair factors. *Molecular Cell*, 34(4), 403–4. doi:10.1016/j.molcel.2009.05.009

Sung, J. S., Park, K. H., & Kim, Y. H. (2010). Genomic alterations of chromosome region 11p as predictive marker by array comparative genomic hybridization in lung adenocarcinoma patients. *Cancer*

Suzuki, Y., Orita, M., Shiraishi, M., Hayashi, K., & Sekiya, T. (1990). Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*, 5(7), 1037–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2197591>

Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1137–1146. doi:10.1172/JCI31405

Sy, S. M.-H., Wong, N., Lee, T.-W., Tse, G., Mok, T. S.-K., Fan, B., ... Yim, a. (2004). Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *European Journal of Cancer*, 40(7), 1082–1094. doi:10.1016/j.ejca.2004.01.012

Tai, A. L. S., Phil, M., Yan, W., Ph, D., Fang, Y., Xie, D., ... Ph, D. (2004). Recurrent Chromosomal Imbalances in Nonsmall Cell Lung Carcinoma The Association between 1q Amplification and Tumor Recurrence, (March), 6–8. doi:10.1002/cncr.20190

Takamochi, K., Ogura, T., Suzuki, K., Kawasaki, H., Kurashima, Y., Yokose, T., ... Esumi, H. (2001). Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *The American Journal of Pathology*, 159(5), 1941–1948. doi:10.1016/S0002-9440(10)63041-6

Takano, T., Ohe, Y., Sakamoto, H., Tsuta, K., Matsuno, Y., Tateishi, U., ... Tamura, T. (2005). Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(28), 6829–37. doi:10.1200/JCO.2005.01.0793

Takeuchi, K., Choi, Y. L., Togashi, Y., Soda, M., Hatano, S., Inamura, K., ... Mano, H. (2009). KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(9), 3143–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3248

Tamura, K., Zhang, X., Murakami, Y., Hirohashi, S., Xu, H. J., Hu, S. X., ... Sekiya, T. (1997). Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 74(1), 45–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036868>

Tanaka, R., Wang, D., Morishita, Y., Inadome, Y., Minami, Y., Iijima, T., ... Noguchi, M. (2005). Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 103(3), 608–15. doi:10.1002/cncr.20827

Tao, D., Han, X., Zhang, N., Lin, D., Wu, D., Zhu, X., ... Shi, Y. (2016). Genetic alteration profiling of patients with resected squamous cell lung carcinomas. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.9096

Tao, H., Hayashi, T., Sano, F., Takahagi, A., Tanaka, T., Matsuda, E., & Okabe, K. (2013). Prognostic impact of lymphovascular invasion compared with that of visceral pleural invasion in patients with pN0 non-small-cell lung cancer and a tumor diameter of 2 cm or smaller. *The Journal of Surgical Research*, 185(1), 250–4. doi:10.1016/j.jss.2013.05.104

The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM). (2013). A genomics-based classification of human lung tumors. *Science Translational Medicine*, 5(209), 209ra153. doi:10.1126/scitranslmed.3006802

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007

Toutenhoofd, S. L., Foletti, D., Wicki, R., Rhyner, J. A., Garcia, F., Tolon, R., & Strehler, E. E. (1998). Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium*, 23(5), 323–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9681195>

Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, A. G. (2015). WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Fourth edition - WHO - OMS - IARC. Retrieved from <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4007>

Travis, W. D. (2011). Pathology of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 669–92. doi:10.1016/j.ccm.2011.08.005

Travis, W. D., Brambilla, E., Müller-hermelink, H. K., & Travis, W. D., Brambilla, E., Müller-hermelink, H. K., & Harris, C. C. (n.d.). World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification Tumours of the Lung , Pleura , Thymus and Heart Pathology & Genetics Tumours of the Lung , Pleura , Thymu, C. C. (n.d.). World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification Tumours of the Lung , Pleura , Thymus and Heart Pathology & Genetics Tumours of the Lung , Pleura , Thymus and Heart. Heart.

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6(2), 244–85. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., ... Tsao, M. (2013). Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(5), 685–705. doi:10.5858/arpa.2012-0264-RA

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., ... Tsao, M. (2013). Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(5), 668–84. doi:10.5858/arpa.2012-0263-RA

Truong, T., Hung, R. J., Amos, C. I., Wu, X., Bickeböller, H., Rosenberger, A., ... Spitz, M. R. (2010). Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: A pooled analysis from the international lung cancer consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 102, 959–971.

Tseng, R.-C., Hsieh, F.-J., Hsu, H.-S., & Wang, Y.-C. (2008). Minimal deletion regions in lung squamous cell carcinoma: association with abnormality of the DNA double-strand break repair genes and their applications on gene identification and prognostic biomarkers. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 59(3), 332–9. doi:10.1016/j.lungcan.2007.08.038

Tsuta, K., Kawago, M., Inoue, E., Yoshida, A., Takahashi, F., Sakurai, H., ... Tsuda, H. (2013). The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer*, 81(3), 371–376. doi:10.1016/j.lungcan.2013.06.012

Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 10(2), 116–29. doi:10.1038/nrc2780

Umemura, S., Mimaki, S., Makinoshima, H., Tada, S., Ishii, G., Ohmatsu, H., ... Goto, K. (2014). Therapeutic Priority of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Small Cell Lung Cancers as Revealed by a Comprehensive Genomic Analysis. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(9), 1324–31. doi:10.1097/JTO.0000000000000250

Uramoto, H., & Tanaka, F. (2014). Recurrence after surgery in patients with NSCLC. *Translational Lung Cancer Research*, 3(4), 242–9. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.12.05

Vageli, D., Daniil, Z., Dahabreh, J., Karagianni, E., Vamvakopoulou, D. N., Ioannou, M. G., ... Koukoulis, G. K. (2009). Phenotypic mismatch repair hMSH2 and hMLH1 gene expression profiles in primary non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 64(3), 282–8. doi:10.1016/j.lungcan.2008.09.018

van der Riet-Fox, M. F., Retief, A. E., & van Niekerk, W. A. (1979). Chromosome changes in 17 human neoplasms studied with banding. *Cancer*, 44(6), 2108–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/509390>

Varella-Garcia, M. (2010). Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adhesion and Migration*, 4(1), 100–106. doi:10.4161/cam.4.1.10884

Varella-Garcia, M., Diebold, J., Eberhard, D. A., Geenen, K., Hirschmann, A., Kockx, M., ... Cappuzzo, F. (2009). EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 62(11), 970–7. doi:10.1136/jcp.2009.066548

Varlotto, J. M., Yao, A. N., DeCamp, M. M., Ramakrishna, S., Recht, A., Flickinger, J., ... Kelsey, C. R. (2015). Nodal stage of surgically resected non-small cell lung cancer and its effect on recurrence patterns and overall survival. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 91(4), 765–73. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.12.028

Volm, M., Drings, P., Wodrich, W., & van Kaick, G. (1993). Expression of oncoproteins in primary human non-small cell lung cancer and incidence of metastases. *Clinical & Experimental Metastasis*, 11(4), 325–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8100491>

Wang, J., Zhang, Y., Wan, H., Dong, N., Bao, L., Sun, X., ... Wang, X. (2015). Global analyses of subtype- or stage-specific genes on chromosome 7 in patients with lung cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 333–345. doi:10.1007/s10555-015-9568-y

Wang, Y., Broderick, P., Webb, E., Wu, X., Vijayakrishnan, J., Matakidou, A., ... Houlston, R. S. (2008). Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nature Genetics*, 40(12), 1407–9. doi:10.1038/ng.273

Wang, Y., Chen, J., Wu, S., Hu, C., Li, X., Wang, Y., ... Chen, W. (2014). Clinical effectiveness and clinical toxicity associated with platinum-based doublets in the first-line setting for advanced non-squamous non-small cell lung cancer in Chinese patients: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 14, 940. doi:10.1186/1471-2407-14-940

Wang, Y., Zhang, P., Liu, Z., Wang, Q., Wen, M., Wang, Y., ... Wei, G. (2014). CUL4A overexpression enhances lung tumor growth and sensitizes lung cancer cells to erlotinib via transcriptional regulation

of EGFR. *Molecular Cancer*, 13, 252. doi:10.1186/1476-4598-13-252

Wang, Y.-C., Lu, Y.-P., Tseng, R.-C., Lin, R.-K., Chang, J.-W., Chen, J.-T., ... Chen, C.-Y. (2003). Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 887–95. doi:10.1172/JCI15475

Warth, A., Muley, T., Dienemann, H., Goeppert, B., Stenzinger, A., Schnabel, P. A., ... Weichert, W. (2014). ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology*, 65(2), 187–94. doi:10.1111/his.12379

Weber, R. G., Scheer, M., Born, I. A., Joos, S., Cobbers, J. M., Hofele, C., ... Lichter, P. (1998). Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. *The American Journal of Pathology*, 153(1), 295–303. doi:10.1016/S0002-9440(10)65571-X

Wei, Y., Vellanki, R. N., Coyaud, É., Ignatchenko, V., Li, L., Krieger, J. R., ... Moran, M. F. (2015). CHCHD2 Is Coamplified with EGFR in NSCLC and Regulates Mitochondrial Function and Cell Migration. *Molecular Cancer Research : MCR*, 13(7), 1119–29. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0165-T

Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Research*, 68(9), 3077–80; discussion 3080. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3293

Weir, B. A., Woo, M. S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., Beroukhi, R., ... Meyerson, M. (2007). Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, 450(7171), 893–8. doi:10.1038/nature06358

Weiske, J., Albring, K. F., & Huber, O. (2007). The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20344–9. doi:10.1073/pnas.0703664105

Westermarck, U. K., Wilhelm, M., Frenzel, A., & Henriksson, M. A. (2011). The MYCN oncogene

and differentiation in neuroblastoma. *Seminars in Cancer Biology*, 21(4), 256–66. doi:10.1016/j.semcancer.2011.08.001

Whang-Peng, J., Kao-Shan, C. S., Lee, E. C., Bunn, P. A., Carney, D. N., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23). *Science* (New York, N.Y.), 215(4529), 181–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6274023>

Wistuba, I. I., Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma, (May 1998).

Wistuba, I. I., Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18(3), 643–50. doi:10.1038/sj.onc.1202349

Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., ... Minna, J. D. (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research*, 60(7), 1949–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766185>

Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K., Milchgrub, S., Syed, S., Lam, S., ... Gazdar, A. F. (1999). Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Research*, 59(8), 1973–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213509>

Wistuba, I. I., & Gazdar, A. F. (2006). Lung cancer preneoplasia. *Annual Review of Pathology*, 1, 331–348. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100103

Wistuba, I. I., Lam, S., Behrens, C., Arvind, K., Fong, K. M., Samet, J. M., ... Gazdar, A. F. (1997). Molecular Damage in the Bronchial Epithelium of Current and Former Smokers Identification of Preinvasive Lesions, 89(18).

World Health Organization, N. (2008). The Global Burden of Disease: 2004 update. Update, 2010, 146. doi:10.1038/npp.2011.85

World Health Statistics. (2011). Causes of death 2008 : data sources and methods. World Health, 2010(September 2010), 1–28. Retrieved from [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/cod\\_2008\\_sources\\_methods.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf)

Yakut, T., Demir, A., Frank, D., Gebitekin, C., Kahler, E., & Danner, B. (2006). Assessment of molecular events in squamous and non-squamous cell lung carcinoma Bastian Gunawan b , Nur U o F " uzesi b. doi:10.1016/j.lungcan.2006.08.011

Yang, H.-S., & Horten, B. (2014). Gain of copy number and amplification of the RET gene in lung cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3), 465–9. doi:10.1016/j.yexmp.2014.10.002

Yang, J.-J., Zhang, X.-C., Su, J., Xu, C.-R., Zhou, Q., Tian, H.-X., ... Wu, Y.-L. (2014). Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(5), 1383–92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0699

Yasui, K., Arii, S., Zhao, C., Imoto, I., Ueda, M., Nagai, H., ... Inazawa, J. (2002). TFDP1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(6), 1476–84. doi:10.1053/jhep.2002.33683

Yatabe, Y., Takahashi, T., & Mitsudomi, T. (2008). Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification Is Acquired in Association with Tumor Progression of EGFR -Mutated Lung Cancer, (7), 2106–2112. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5211

Yokota, J., Nishioka, M., Tani, M., & Kohno, T. (2003). Genetic alterations responsible for metastatic phenotypes of lung cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(3), 189–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12741677>

Yoo, J. W., Seo, K. W., Jang, S. J., Oh, Y. M., Shim, T. S., Kim, W. S., ... Choi, C. M. (2010). The relationship between the presence of chromosomal instability and prognosis of squamous cell carcinoma of the lung: Fluorescence in situ hybridization analysis of paraffin-embedded tissue from 47 Korean patients. *Journal of Korean Medical Science*, 25(6), 863–867. doi:10.3346/jkms.2010.25.6.863

Yoshida, Y., Shibata, T., Kokubu, A., Tsuta, K., Matsuno, Y., Kanai, Y., ... Hirohashi, S. (2005). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. doi:10.1016/j.lungcan.2005.04.012

Yoshizawa, A., Motoi, N., Riely, G. J., Sima, C. S., Gerald, W. L., Kris, M. G., ... Travis, W. D. (2011). Impact of proposed IASLC / ATS / ERS classification of lung adenocarcinoma : prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Modern Pathology*, 24(5), 653–664. doi:10.1038/modpathol.2010.232

Yoshizawa, A., Sumiyoshi, S., Sonobe, M., Kobayashi, M., Fujimoto, M., Kawakami, F., ... Haga, H. (2013). Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 8(1), 52–61. doi:10.1097/JTO.0b013e3182769aa8

Yuan, S., Yu, S.-L., Chen, H.-Y., Hsu, Y.-C., Su, K.-Y., Chen, H.-W., ... Yang, P.-C. (2011). Clustered genomic alterations in chromosome 7p dictate outcomes and targeted treatment responses of lung adenocarcinoma with EGFR-activating mutations. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(25), 3435–42. doi:10.1200/JCO.2011.35.3979

Zhang, A., Zheng, C., Lindvall, C., Tumors, H., Hou, M., Ekedahl, J., ... Bjo, M. (2000). Frequent Amplification of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Human Tumors. *Cancer Research*, (Cmm), 6230–6235.

Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D. C., Song, X., Zhang, J., ... Futreal, P. A. (2014). Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science (New*

Zhang, L., Hou, Y., Ashktorab, H., Gao, L., Xu, Y., Wu, K., ... Zhang, L. (2010). The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 344(1-2), 125–35. doi:10.1007/s11010-010-0536-0

Zhang, N. N., Liu, Y. T., Ma, L., Wang, L., Hao, X. Z., Yuan, Z., ... Shi, Y. (2014). The molecular detection and clinical significance of ALK rearrangement in selected advanced non-small cell lung cancer: ALK expression provides insights into ALK targeted therapy. *PLoS ONE*, 9(1). doi:10.1371/journal.pone.0084501

Zhang, Q., Dai, H.-H., Dong, H.-Y., Sun, C.-T., Yang, Z., & Han, J.-Q. (2014). EGFR mutations and clinical outcomes of chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 85(3), 339–45. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.011

Zhao, N., Wilkerson, M. D., Shah, U., Yin, X., Wang, A., Hayward, M. C., ... Hayes, D. N. (2014). Alterations of LKB1 and KRAS and risk of brain metastasis: Comprehensive characterization by mutation analysis, copy number, and gene expression in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 86(2), 255–261. doi:10.1016/j.lungcan.2014.08.013

Zhi, X., Giroux-Leprieur, E., Wislez, M., Hu, M., Zhang, Y., Shi, H., ... Wang, L. (2015). Human RNA polymerase II associated factor 1 complex promotes tumorigenesis by activating c-MYC transcription in non-small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), 685–690. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.017

Zhu, C.-Q., Cutz, J.-C., Liu, N., Lau, D., Shepherd, F. A., Squire, J. A., & Tsao, M.-S. (2006). Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 94(10), 1452–9. doi:10.1038/sj.bjc.6603110













































































































