



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**MARCADORES PREDICTIVOS EN EL TRASPLANTE Y LA
CARCINOGENÉISIS PULMONAR. ANÁLISIS METABOLÓMICO Y
RUTA DE SEÑALIZACIÓN DYRK2-SIAH2**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Medicina por

Paula M^a Moreno Casado

Directores

Marco Antonio Calzado Canale

Ángel Salvatierra Velázquez

Córdoba, Septiembre de 2015

TITULO: *Marcadores predictivos en el trasplante y la carcinogénesis pulmonar.
Análisis metabolómico y ruta de señalización DYRK2-SIAH2*

AUTOR: *Paula María Moreno Casado*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: MARCADORES PREDICTIVOS EN EL TRASPLANTE Y LA CARCINOGENESIS PULMONAR. ANÁLISIS METABOLÓMICO Y RUTA DE SEÑALIZACIÓN DYRK2-SIAH2.

DOCTORANDO/A: PAULA MARÍA MORENO CASADO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El documento presentado por la doctoranda Paula María Moreno Casado, con título "Marcadores predictivos en el trasplante y la carcinogénesis pulmonar. Análisis metabólico y ruta de señalización DYRK2-SIAH2", corresponde a su trabajo de tesis doctoral realizado en el periodo comprendido entre Marzo de 2011 y Enero de 2015. En este trabajo se han cumplido los objetivos establecidos al comienzo del proyecto, de manera que se ha llevado a cabo una investigación profunda en el campo del trasplante pulmonar, para la búsqueda de marcadores predictivos en el mismo. Del mismo modo, a nivel experimental ha realizado un cronograma de trabajo que le ha permitido aprender técnicas experimentales de gran relevancia y utilidad en el campo de la investigación.

Este trabajo ha permitido la obtención de resultados acerca de los marcadores predictivos en el trasplante pulmonar, fundamentalmente en lo que respecta al uso de donantes con criterios extendidos para solventar el problema de la escasez de donantes pulmonares válidos. En la misma línea se investigó, en primer lugar, la posible influencia de la causa de la muerte del donante en los resultados del trasplante, comparando los donantes fallecidos por causa traumática con las demás causas de muerte encefálica; seguidamente se compararon los resultados obtenidos con la extracción pulmonar temprana frente a la tardía en los donantes de causa traumática, encontrándose que la extracción pulmonar temprana no afecta negativamente los resultados a corto o largo plazo del trasplante pulmonar en pacientes con EPOC o Fibrosis Quística, pero sí que impacta negativamente en los receptores con Fibrosis Pulmonar.

Respecto a la búsqueda de marcadores predictivos de carcinogénesis pulmonar, se evidenció la existencia de una importante asociación entre la expresión de SIAH2 y el cáncer de pulmón, que se relaciona además con el grado histológico y un descenso en la expresión de algunos de sus sustratos, tales como DYRK2. Finalmente, se analizó el perfil metabólico del cáncer de pulmón, en muestras procedentes de pacientes intervenidos por cáncer, comprándose los cambios observados en los metabolitos con los niveles de los mismos en el tejido sano del mismo paciente. Las principales modificaciones metabólicas observadas en el cáncer de pulmón correspondieron a la utilización de la glucosa, la oxidación lipídica, el metabolismo de la arginina y poliaminas, así como el de los fosfolípidos.

La finalidad del estudio ha sido compensada con la publicación de varios artículos científicos en una revista indexada dentro del primer cuartil de su área. De manera conjunta a la elaboración de este proyecto, se han realizado trabajos en apoyo a otros miembros del grupo los cuales también han contribuido al avance y finalización

de este trabajo dando lugar a otras publicaciones. Además, se ha dado difusión a los resultados obtenidos de todos los trabajos mediante la presentación de los mismos a jornadas y congresos siendo expuestos tanto mediante comunicaciones orales como comunicaciones tipo póster.

PUBLICACIONES Y TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

_ *Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.*

- 1. Extended recipients but not extended donors are associated with poor outcomes following lung transplantation.** Paula Moreno, Antonio Álvarez, Francisco Santos, José Manuel Vaquero, Carlos Baamonde, Javier Redel, Francico Cerezo, Francico Javier Algar, Ángel Salvatierra. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 45 (2014) 1040–1047. Factor de impacto: 3,3. Área temática: Cirugía. Posición de la revista: 26 de 198 (Primer cuartil, **Q1**).
- 2. Early lung retrieval from traumatic brain-dead donors does not compromise outcomes following lung transplantation.** Paula Moreno, Antonio Álvarez, Jennifer Illana, Dionisio Espinosa, Carlos Baamonde, Francisco Cerezo, Francisco Javier Algar, Ángel Salvatierra. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2013 Jun;43(6):e190-7. Factor de impacto: 3,05. Área temática: Cirugía. Posición de la revista: 27 de 204 (Primer cuartil, **Q1**).
- 3. Lung transplantation for cystic fibrosis: differential characteristics and outcomes between children and adults.** Paula Moreno, Antonio Álvarez, Guadalupe Carrasco, Javier Redel, Carlos Baamonde, Francisco Javier Algar, Francisco Cerezo, Ángel Salvatierra. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2015. Factor de impacto: 3,05. Área temática: Cirugía. Posición de la revista: 27 de 204 (Primer cuartil, **Q1**). *Aceptado. En prensa.*
- 4. The Expression of the Ubiquitin Ligase SIAH2 (seven *in absentia* homolog 2) is Increased in Human Lung Cancer.** Paula Moreno, Maribel Lara, Rafael Soler, Teresa Caro, Manuel Medina, Antonio Álvarez, Ángel Salvatierra, Eduardo Muñoz y Marco A. Calzado. *PLoS ONE*. Factor de impacto: 3,234. Área temática: Ciencias Multidisciplinares. Posición de la revista: 8 de 56 (Primer cuartil, **Q1**). *En revisión.*

Publicaciones en colaboración durante el desarrollo de la tesis doctoral.

- 1. Prognostic model of survival for typical bronchial carcinoid tumors: Analysis of 1109 patients on behalf of the European Society of Thoracic Surgeons-Neuroendocrine Tumors Working Group.** Filosso PL, Guerrero F, Evangelista A, Welter S, Thomas P, Moreno Casado P, Rendina EA, Venuta F, Ampollini L, Brunelli A, Asadi N, Raveglia F, Larocca V, Rena O, Margaritora S, Ardisson F, Travis WD, Sarkaria I, and the ESTS NETs Steering Committee. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015 Sep;48(3):441-7. Factor de impacto: 3,05. Área temática: Cirugía. Posición de la revista: 27 de 204 (Primer cuartil, **Q1**).
- 2. Clinical management of atypical carcinoid and large-cell neuroendocrine carcinoma: a multicentre study on behalf of the European Association of Thoracic Surgeons (ESTS) Neuroendocrine Tumours of the Lung Working Group.** Filosso PL, Rena O, Guerrero F, Moreno Casado P, Sagan D, Raveglia F, Brunelli A, Welter S, Gust L, Pompili C, Casadio C, Bora G, Alvarez A, Zaluska W, Baisi A, Roesel C, Thomas PA; ESTS NETs-WG Steering Committee. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015 Jul;48(1):55-64. Factor de impacto: 3,05. Área temática: Cirugía. Posición de la revista: 27 de 204 (Primer cuartil, **Q1**).
- 3. CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2.** Carmen García-Limones, Maribel Lara, Carla Jiménez, Moisés Pérez, Paula Moreno, Eduardo Muñoz and Marco A. Calzado. *Oncogene*. Factor de impacto: 8,459. Área temática: Oncología. Posición de la revista: 13 de 211 (Primer cuartil, **Q1**). *En revisión.*

4. **Influence of donor-recipient gender mismatch on graft function and survival following lung transplantation.** Alvarez A, Moreno P, Illana J, Espinosa D, Baamonde C, Arango E, Algar FJ, A Salvatierra. Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery 2013;16:426–436. Factor de impacto: 1.155. Área temática: Sistema cardiovascular y cardiaco. Posición de la revista: 92 de 123 (Primer cuartil, **Q3**).

COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS INTERNACIONALES.

1. **Early lung retrieval from traumatic brain-dead donors does not compromise outcomes following lung transplantation.** Moreno P, Álvarez A, Illana J, Espinosa D, Baamonde C, Cerezo F, Algar FJ, Salvatierra A. 20th European Conference on General Thoracic Surgery. Essen (Alemania) 10-13 Junio. 2012.

2. **Influence of donor-recipient gender mismatch on early graft function and mortality following lung transplantation.** Álvarez A, Moreno P, Illana J, Espinosa D, Baamonde C, Arango E, Algar FJ, Salvatierra A. 20th European Conference on General Thoracic Surgery. Essen (Germany) 10-13 Junio. 2012.

COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS NACIONALES.

- **Decorticación pleuropulmonar en paciente con atrapamiento pulmonar completo de causa no filiada.** G. Carrasco Fuentes, P. Moreno Casado, A. Álvarez Kindelán, E. Arango Tomás, H.D. Guamán Arcos, F.J. Algar Algar, F. Cerezo Madueño, C. Baamonde Laborda, Á. Salvatierra Velázquez. IV Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT). Madrid, Mayo 2013.

- **Tumores carcinoides broncopulmonares. Treinta y dos años de experiencia quirúrgica.** C. Baamonde, P. Moreno, A. Álvarez, G. Carrasco, E. Arango, F.J. Algar, F. Cerezo, Á. Salvatierra. IV Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT). Madrid, Mayo 2013.

- **Resección Combinada en acto único de metástasis hepáticas y pulmonares de cáncer colorrectal.** Baamonde Laborda C, Espinosa Jiménez D, Moreno Casado P, Illana Wolf J, Arango Tomas E, Carrasco G, Algar Algar J, Álvarez Kindelán A, Cerezo Madueño F, Salvatierra Velázquez A. III Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT). Madrid 16-18 Mayo, 2012.

- **Cirugía de las metástasis pulmonares. Experiencia del Hospital Reina Sofía en 2011.** Arango Tomas E, Algar Algar FJ, Cerezo Madueño F, Moreno Casado P, Álvarez Kindelán A, Baamonde Laborda C, Salvatierra Velázquez A. 29º Congreso Nacional de Cirugía. Madrid, 12-15 Noviembre 2012.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN JORNADAS

- **Metabolomic profiling and fingerprinting of human lung adenocarcinomas.** Paula Moreno, Maribel Lara, Noel Garcia, Carmen Navarrete, Antonio Álvarez, Angel Salvatierra, Eduardo Muñoz and Marco A. Calzado. V Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba, 6 Mayo 2014.

- **Trasplante pulmonar de donantes con criterios extendidos.** P Moreno, A Álvarez, C Baamonde, JM Vaquero, F Santos, A Requejo, G Carrasco, F Cerezo, J Algar, A Salvatierra. VIII Congreso de la Sociedad Andaluza de Trasplante de Órganos y Tejidos (SATOT) celebrado en Cádiz los días 17 y 18 de junio de 2013.

- **El receptor de alto riesgo: impacto en los resultados del trasplante pulmonar.** Moreno Casado, Paula; Álvarez Kindelán, Antonio; Baamonde Laborda, Carlos; Vaquero Barrios, José Manuel; Redel Montero, Javier; Requejo Jiménez, Antonio; Santos Luna, Francisco; Carrasco Fuentes, Guadalupe; Cerezo Madueño, Francisco; Algar Algar, Francisco Javier; Salvatierra Velázquez, Ángel. VIII Congreso de la Sociedad Andaluza de Trasplante de Órganos y Tejidos (SATOT) celebrado en Cádiz los días 17 y 18 de junio de 2013.

- **The Ubiquitin Ligase SIAH2 as a Prognostic and Predictive Marker in Lung Cancer.** P Moreno, Maribel Lara, Carmen García-Limones, Teresa Caro, Manuel

Medina, Ángel Salvatierra, Eduardo Muñoz and Marco A Calzado. IV Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba, 14 Mayo 2013.

PREMIOS OBTENIDOS.

- **Premio a la mejor comunicación en formato póster.** V Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba, 6 Mayo 2014.

- **Premio a la mejor comunicación oral en la sección de oncología/oncohematología.** IV Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC. Córdoba, 14 Mayo 2013.

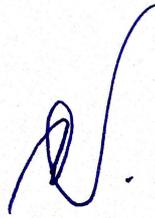
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 23 de Septiembre de 2015

Firma del/de los director/es



Fdo.: Marco A. Calzado Canale



Fdo.: Ángel Salvatierra Velázquez

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis llevado a cabo en la universidad de Córdoba y el hospital universitario reina sofía de Córdoba ha sido fruto de un gran esfuerzo en el cual han participado, directa e indirectamente, diferentes compañeros de trabajo, a los que ahora quiero dar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mis directores de tesis Marco Calzado y Ángel Salvatierra. A Marco, por haberme aceptado, al principio de “rebote”, y luego, por soportarme y apoyarme cuando más ganas tuve de dejarlo. Y, a Ángel, por haber sido mi mentor en la cirugía torácica. gracias a la confianza que han depositado en mi he podido cumplir el sueño de realizar una tesis doctoral y haber contribuido al avance científico. no tengo manera de agradecerles estos años de intenso trabajo.

Quiero agradecer también por la enorme ayuda prestada a mis compañeros del departamento de inmunología de la facultad de medicina. cuando llegué al laboratorio no sabía ni coger una pipeta. y ellos me enseñaron con enorme paciencia todos los procedimientos que eran imprescindibles para que yo obtuviera mis resultados con éxito. Desde luego, mis agradecimientos a Lourdes y a Amaya, por la paciencia que tuvieron conmigo en todas las fases de mi aprendizaje y mi estancia en el laboratorio. no quisiera olvidarme también de Rafa, Moisés, las 3 Cármenes y Juan Antonio. y tampoco de las que más me han soportado en mis momentos de bajón y las que más me han ayudado con mi trabajo en la última etapa, Maribel y Carla. A todos los demás becarios y postdoctorales que pasaron de forma más efímera por el laboratorio, también les quiero dar las gracias por haberles conocido y haberme enriquecido con ello.

Un especial agradecimiento a mis compañeros del servicio de Cirugía Torácica del hospital reina sofía, que ya es mi segunda familia. a Antonio, Carlos, Javier y Paco, por haberme enseñado todo lo que sé. quiero daros las gracias por darme la oportunidad de compartir cada día con vosotros, y poder seguir aprendiendo a vuestro lado. A Guadalupe, Darío, Diego y Javi, por el enorme trabajo asistencial que hacen a diario, gracias al cual me ha permitido poder terminar este proyecto al fin. A Dioni y Jennifer, aunque estéis lejos os llevo conmigo siempre, sois para mí como mis hermanos pequeños. A Araceli, Pilar, Joaqui y María, por implicaros en el proyecto y ayudarme en todo lo que he necesitado en este tiempo. A las demás enfermeras de la planta, se haría muy largo escribir todos vuestros nombres, pero os agradezco haberme enseñado el manejo de los pacientes de tórax cuando llegué después del rotatorio en cirugía general. Cómo no, a Pedro López Cillero, Javier Briceño y Antonio

Luque, por ese año que estuve rotando y aprendiendo los principios básicos de la cirugía, por despertar en mí esa pasión por operar y mejorar cada día como cirujana y como persona.

Quiero agradecer también parte de este trabajo a mi amiga del alma, Auxi, mi “hermana”. por sus valoraciones, comentarios e interés hacia mi trabajo, pero también por haber estado ahí cuando más lo necesité, en mis momentos de bajón y en los de alegría. Estás lejos pero es como si te hubieras ido ayer a las islas. Gracias por TODO.

Finalizando, toca el turno a la familia. Mamá, Papá, mis hermanos Rafa y Pedro, y mi marido, Jorge. Gracias de verdad. Habéis conseguido que la parte no científica y no laboral de esta tesis haya sido posible. Por aguantarme en los momentos buenos y en los menos buenos, por sufrir mis enfados y agobios derivados del trabajo y saber derivarlos hacia algo mejor.

Y, en último lugar, a mi querido gordito “Ronnie”, mi perro. Llegaste a mi vida el mismo mes que empezaba a trabajar de residente en el hospital, y nos dejaste el año pasado. Jamás pensé que ibas a calar tan hondo en mí, ni que un animal iba a ser capaz de ser tan fiel, tan cariñoso y tan buen compañero como lo fuiste tú. Me soportaste los días malos, cuando no te hacía ni caso cuando ladrabas para jugar, para comer, para hacer pis o porque te daba por ahí ese día. Perdóname por no haberte dedicado el tiempo que te merecías, por haberme perdido el día a día a tu lado. Contigo todos los problemas se esfumaban de mi cabeza. Te echo de menos, y te querré siempre.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	16
II. RESUMEN Y ABSTRACT	21
a. Resumen	21
b. Abstract	23
III. INTRODUCCIÓN	26
a. Enfermedades del aparato respiratorio	26
b. Trasplante de pulmón	27
c. Cáncer de pulmón	30
i. Epidemiología	30
ii. Etiología	30
iii. Clasificación histológica	31
iv. Manifestaciones clínicas, formas de presentación	32
v. Diagnóstico, estadificación TNM	32
vi. Tratamiento, supervivencia	33
vii. Marcadores tumorales	34
d. SIAH2 (Seven in absentia homolog-2)	36
i. Estructura y función	37
ii. Expresión y localización	38
iii. Regulación	38
iv. SIAH2 y cáncer	39
e. Metabolómica	40
i. Conceptos generales	40
ii. Métodos y técnicas de análisis metabolómico	42
iii. Aplicación en cáncer	42
iv. Metabolómica y cáncer de pulmón	43
IV. OBJETIVOS	46
V. MATERIAL Y MÉTODOS	49
a. Estudio de marcadores predictivos en el trasplante pulmonar	49
i. Población y diseño de estudio	49
1. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar	49
2. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia	51

ii. Evaluación del donante y técnica de extracción y preservación pulmonar	51
iii. Técnica quirúrgica del trasplante pulmonar.....	53
iv. Manejo post-trasplante	53
v. Definiciones.....	54
vi. Estudio estadístico.....	54
b. Estudio de marcadores predictivos en carcinogénesis pulmonar.	
Análisis metabolómico y ruta de señalización DYRK2-SIAH2.....	56
i. Pacientes y muestras.....	56
ii. Análisis histológico.....	57
iii. Extracción de ARN y qRT-PCR	58
iv. Determinación de la expresión de proteínas mediante western-blot.....	59
v. Modelo de diferenciación a fenotipo epidermoide con células BEAS-2B	60
vi. Metabolómica.....	60
vii. Análisis estadístico.....	61
VI. RESULTADOS	63
a. Estudio de marcadores predictivos en el trasplante pulmonar.....	63
i. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar..	63
1. Donantes extendidos frente a donantes óptimos.....	63
2. Receptores extendidos frente a receptores óptimos.....	64
3. Análisis en función de las cuatro combinaciones posibles donante-receptor.....	65
4. Síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS).....	66
5. Supervivencia.....	68
ii. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia.....	70
1. Mortalidad.....	73
2. Disfunción primaria del injerto.....	73
3. Supervivencia.....	73
4. Síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS).....	76

b.	Estudio de marcadores predictivos en carcinogénesis pulmonar.	
	Análisis metabólico y ruta de señalización DYRK2-SIAH2	77
	i. Caracterización de la población de estudio	77
	ii. Estudio de la expresión de SIAH2 a nivel de ARNm en el cáncer de pulmón	80
	iii. Estudio de la expresión de SIAH2 a nivel proteico en el cáncer de pulmón	81
	iv. Estudio de la expresión de SIAH2 en función del grado de diferenciación tumoral en el cáncer de pulmón	83
	v. Relación entre la expresión de SIAH2 y las variables clínico-patológicas	84
	vi. Estudio de la expresión de DYRK2 en el cáncer de pulmón	85
	vii. Análisis metabólico del carcinoma broncogénico	86
	1. Perfil metabólico	86
	2. Metabolismo celular de la glucosa en el cáncer de pulmón	87
	3. Niveles de glutatión y otros marcadores de estrés oxidativo en el cáncer de pulmón	89
	4. Metabolismo de la arginina y poliaminas en el cáncer de pulmón	91
	5. Metabolismo de los ácidos grasos en el cáncer de pulmón	92
	6. Marcadores de respuesta inflamatoria en el cáncer de pulmón	93
	7. Metabolismo de los fosfolípidos en el cáncer de pulmón	94
	8. Metabolismo del carbono en el cáncer de pulmón	95
	9. Catabolismo de nucleótidos en el cáncer de pulmón	95
VII.	DISCUSIÓN	98
a.	Estudio de marcadores predictivos en el trasplante pulmonar	98
	i. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar	98
	ii. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia	101
b.	Estudio de marcadores predictivos en el cáncer de pulmón	104
	i. Expresión de SIAH2 y DYRK2 en el cáncer de pulmón	104
	ii. Perfil metabólico del cáncer de pulmón	107
VIII.	CONCLUSIONES	113

IX.	BIBLIOGRAFÍA	116
X.	ANEXOS	130

ABREVIATURAS

I. ABREVIATURAS

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADMA: Dimetilarginina asimétrica
AKT: serina/treonina kinasa, proteína quinasa B
AKAP121: Proteína quinasa de anclaje A 121
AMP: Adenosina monofosfato
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: Adenosina trifosfato

B

BAL: Lavado broncoalveolar
BCL2: Linfoma de células B tipo 2
BHBA: 3 hidroxibutirato
BOS: Bronchiolitis Obliterans Syndrome (Síndrome de Bronquiolitis Obliterante)

C

CCND1: ciclina D1 específica de G1/S
CDKN2A: Inhibidor de ciclina dependiente de quinasa 2A
CDK4: Quinasa dependiente de ciclina 4
CEC: Circulación extracorpórea
CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)
CMP: Citidina Monofosfato
CMV: Citomegalovirus
CP: Cáncer de pulmón
CPCP: Cáncer de pulmón de célula pequeña
CPCNP: Cáncer de pulmón de célula no pequeña

D

DCC: Deleted in colorectal cancer
DE: Donantes extendidos
DO: Donantes óptimos
DYRK2: Quinasa regulada por tirosina de especificidad dual tipo 2

E

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EML4-ALK: Proteína de fusión echinoderm microtubule-associated protein-like 4 con anaplastic lymphoma kinase

EMT: Transición epitelial-mesenquimal

EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERBB2: También conocido como HER2/neu, receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano

F

FHIT: Fragile Histidine Triad Protein

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática

FQ: Fibrosis Quística

G

GC-MS: Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)-Cromatografía de gases/espectrometría de masas

GGT: Gammaglutamil transpeptidasa

GPC: Glicerolfosfolina

G3P: Glicerol 3 fosfato

H

H-E: Hematoxilina-Eosina

HDAC3: Histona deacetilasa 3

HETE: Ácido hidroxí-icosatetraenoico

HIPK2: Quinasa de interacción de homeodominio tipo 2

HODE: Ácido hidroxioctadecadienoico.

HTAP: Hipertensión Pulmonar Idiopática

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

I

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation

K

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

M

MAPK: quinasa activada por mitógeno

MET: receptor del factor de crecimiento hepatocitario

metO: Metionina sulfóxido

miRNA: micro ARN

mTOR: mammalian Target of Rapamycin (diana en mamíferos de la Rapamicina)

MYC: Familia de protooncogenes

MYCL: V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Lung Carcinoma Derived Homolog

MYCN: V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived

MTA: 5 metiltioadenosina

N

NaCl: Cloruro sódico

NaF: Fluoruro de sodio

O

OCT: Optimal cutting temperatura (temperatura óptima de corte)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

P

PaO₂/FiO₂: Presión arterial de oxígeno/Fracción inspirada de oxígeno.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEEP: Presión positiva al final de la espiración

PET/TC: Tomografía por Emisión de Positrones/Tomografía computerizada

PGD: Primary Graft Dysfunction (Disfunción primaria del injerto)

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PML: Proteína de la leucemia promielocítica

PPAR: Receptores activados pre proliferadores de peroxisomas

PHD3: Dioxigenasa de dominio prolil hidroxilasa

PHYL: Proteína de interacción tipo phyllopod

PTEN: Phosphatase and tensin homolog (homólogo de la fosfatasa y de la tensina)

R

RA: Rechazo agudo

RAF: Familia de serina-treonina protein-quinasas

RASSF1A: Ras Association Domain-Containing Protein 1

RB1: Gen del retinoblastoma

RE: Receptores extendidos

RING: really interesting new gene

RO: Receptores óptimos

RQI: Indicador calidad del ARN

S

SAH: S-adenosilhomocisteina

SAS: Servicio Andaluz de Salud

SBD: Dominio de unión a sustrato

SDS: Duodecil sulfato de sodio

SFK11: Src family of tyrosine kinases 11

SIAH2: seven in absentia homolog-2

SINA: seven in absentia

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

SUVmax: maximum standard uptake value

T

THF: 5 metiltetrahidrofolato

TNM: Tumor-Node-Metastasis

TP53: Tumor Protein P53

TRAF: Factor asociado al receptor del TNF

TRAMP: Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate

TRIS-HCL: Tris-ácido clorhídrico

TTBS: tampón Tris salino (tris(hidroximetil)aminometano) con Tween 20 0,1%

TYK2: non-receptor tyrosine-protein kinase 2

U

UNOS: United Network for Organ Sharing

UPLC-MS/MS: Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer

V

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

W

WHO: World Health Organization (organización mundial de la salud)

II. RESUMEN Y ABSTRACT

1. RESUMEN

El cáncer de pulmón continúa representado la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. Esta alta mortalidad refleja, en parte, la limitada eficacia de las terapias actualmente disponibles. Globalmente, el cáncer de pulmón supera en mortalidad a los siguientes tres cánceres más prevalentes juntos (colon, mama y próstata), siendo además el principal contribuyente de nuevos casos de cáncer diagnosticado. La supervivencia global a los 5 años en el cáncer de pulmón ha experimentado pocos cambios en las últimas 3 décadas, permaneciendo en cifras tan bajas como del 11-15%. Dada la pobre supervivencia actual del cáncer de pulmón, y la evidencia existente de que el diagnóstico precoz de la enfermedad reduce la mortalidad, en los últimos años ha cobrado especial interés la búsqueda de biomarcadores del cáncer de pulmón.

HIPK2 y DYRK2, miembros de la familia de quinasas DYRK (dual-specificity tyrosine-regulated kinases), fosforilan SIAH2, modificando así su actividad. En los últimos años se ha atribuido a DYRK2 un posible papel relevante en el desarrollo y/o progresión tumoral asociado con la inducción de la apoptosis en respuesta a estrés oncogénico. En este sentido, DYRK2 fue identificado como el gen más frecuentemente sobre-expresado en el adenocarcinoma pulmón, así como un marcador de pronóstico favorable en este tipo de tumores. Recientemente se ha identificado una regulación mutua entre DYRK2 y la ubiquitin-ligasa SIAH2, en el control de la respuesta a hipoxia y rutas de señalización en el daño genotóxico. El reciente descubrimiento de la existencia de la delección de HIPK2 (con la consiguiente inactivación de p53) en fibroblastos de pulmón, sugiere la existencia de una alteración en la ruta proapoptótica independiente de caspasas. Esta quinasa forma parte de un grupo de enzimas altamente conservadas evolutivamente, pertenecientes a la familia de quinasas DYRK, las cuales juegan un papel clave en la regulación de procesos celulares y de desarrollo, tales como la proliferación y diferenciación celular, la neurogénesis y la citocinesis. El papel de la familia de quinasas DYRK en el cáncer de pulmón es poco conocido, aunque se sabe que desempeña un papel clave en la respuesta al daño al ADN. Así, DYRK2 fosforila a p53 en respuesta al daño genotóxico, induciendo así la apoptosis celular.

La búsqueda de nuevas dianas y estrategias terapéuticas es un paso clave para la lucha contra el cáncer de pulmón. En los últimos años se ha producido un desarrollo exponencial de las ciencias 'ómicas', destacando especialmente la metabolómica. La metabolómica puede definirse como un análisis contextualizado,

tanto cuantitativo como cualitativo, de metabolitos endógenos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico.

El trasplante pulmonar es la única modalidad de tratamiento efectiva para las enfermedades respiratorias en situación de insuficiencia respiratoria terminal. Se estima que sólo el 20% de los donantes multiorgánicos proporcionan pulmones válidos para el trasplante, puesto que se ha demostrado que el pulmón es el órgano más vulnerable en el proceso de muerte encefálica. Para incrementar el pool de donantes pulmonares, muchos grupos han relajado los criterios de aceptación de donantes, aceptando pulmones “marginales”, tras evidenciarse que los resultados del TP son equivalentes. Por otro lado, debido a la escasez de donantes comparado con el crecimiento exponencial de potenciales receptores en la lista de espera, es crucial seleccionar de forma cuidadosa para recibir un TP sólo a aquellos candidatos que más se puedan beneficiar del procedimiento, para maximizar los resultados.

2. ABSTRACT

Lung cancer continues to be the leading cause of cancer-related mortality worldwide. The high mortality highlights the limited efficacy of available therapies for lung cancer treatment. Globally, lung cancer mortality rates exceed those of the next 3 more prevalent cancers combined, and is the largest contributor to new cancer diagnoses. Overall 5-year survival for lung cancer has shown little improvement over the last three decades, remaining as low as 11-15%. Given the poor survival rate of lung cancer, and considering that early diagnosis reduces mortality, special interest in searching for lung cancer biomarkers have been made recently.

HIPK2 and DYRK2, members of the DYRK family (dual-specificity tyrosine-regulated kinases), phosphorylate SIAH2, therefore modifying its activity. Recently, it has been suggested a possible role of DYRK2 in the development and/or progression of tumors, related to the induction of apoptosis in response to oncogenic stress. In this regard, DYRK2 was identified as the most commonly up-regulated gene in lung adenocarcinomas, as well as a favourable prognostic factor in this type of tumors. In the recent years, a mutual regulation between DYRK2 and the ubiquitin-ligase SIAH2 in response to hypoxia and DNA-damage signaling pathways has been demonstrated. The finding of the deletion of HIPK2 (and, subsequently, the inactivation of p53) in lung fibroblasts suggest an alteration of the caspase-dependent proapoptotic route. This kinase belongs to an evolutionarily conserved enzyme family, which belongs to the DYRK family, playing an important role in the regulation of cellular processes and development, such as cell proliferation and differentiation, neurogenesis and cytogenesis. The role of the DYRK family in lung cancer is not well-known, although evidence exists that it phosphorylates p53 in response to genotoxic damage, therefore inducing cell apoptosis.

It is of paramount importance to search for new targets and therapeutic strategies in lung cancer. In the last years, 'omics' sciences and, above all, metabolomics, have developed exponentially. Metabolomics can be defined as a quantitative and qualitative analysis of endogenous low-molecular weight metabolites of a biological system.

Lung transplantation is the only available and effective treatment modality for end-stage respiratory diseases. Only 20% of all multiorgan donors provide lungs suitable for transplantation, because lung is specially vulnerable to be damaged during brain death. In order to increase lung donor pool, several lung transplant groups have relaxed classic acceptance criteria, accepting marginal donor lungs, as results of lung

transplantation are, at least, equivalent. The shortage of donors for LT highlights the need for strict selection of LT candidates, to ensure that there is a maximum benefit and better use of such a scarce resource.

INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades del aparato respiratorio

Las enfermedades del aparato respiratorio figuran entre las condiciones médicas más prevalentes a nivel mundial, figurando además entre las principales causas de muerte. Las infecciones respiratorias (principalmente, neumonía y tuberculosis), el cáncer de pulmón (CP) y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en conjunto, causaron 7,8 millones de muertes en el mundo en 2012, representando la sexta parte del total de fallecimientos ocurridos [The 10 most common causes of death in 2012. World Health Organization (WHO) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>]. Entre las enfermedades pulmonares más prevalentes destacan la EPOC, la Fibrosis Quística (FQ), la Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa (EPID) y el CP.

La EPOC es una enfermedad pulmonar progresiva que se caracteriza por una obstrucción irreversible al flujo aéreo (1). Actualmente, la EPOC es un problema de salud global cuya incidencia está aumentando a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo (2). Se estima que 15 millones de norteamericanos y alrededor de 210 millones de individuos en el mundo padecen EPOC (3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la EPOC será la 3ª causa de muerte en el mundo para el año 2030 [World Health Statistics 2012. http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS12_Full.pdf]. La EPOC tipo enfisema y el enfisema por déficit de α 1-antitripsina se han convertido en la actualidad en la principal indicación de trasplante pulmonar (4).

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad hereditaria más letal en la raza caucásica, con una incidencia de 1 caso por cada 3000 nacidos vivos (5). La enfermedad se produce como consecuencia de una alteración en el gen regulador de la conductancia transmembránica de la FQ (CFTR) (6), con una herencia autosómica recesiva (7). La principal función de esta proteína consiste en facilitar el transporte activo de iones de cloro hacia el exterior de la membrana celular (6). La afectación pulmonar, principal fuente de morbilidad y mortalidad, se caracteriza por episodios recurrentes de infección e inflamación, que desembocan en un fracaso respiratorio. La única modalidad terapéutica curativa en la actualidad sigue siendo el trasplante pulmonar (8).

Bajo el término de EPID se incluye un grupo heterogéneo de más de 150 patologías que difieren en cuanto a su etiología subyacente y fisiopatología, así como

su prevención, tratamiento y pronóstico, pero comparten signos radiológicos, fisiología y manifestaciones patológicas (9). La Fibrosis Pulmonar idiopática (FPI) es el subtipo más frecuente de todos y el más agresivo (10). A pesar de los avances en el diagnóstico, sigue siendo una enfermedad incurable, de forma que la mediana de supervivencia desde el diagnóstico es de unos 3 años (11). Debido a la ausencia de tratamiento médico eficaz, y a que la progresión de la enfermedad es inevitable, el trasplante pulmonar sigue siendo la única opción terapéutica válida (12).

2. Trasplante de pulmón

El trasplante de pulmón constituye la única opción terapéutica para una gran variedad de enfermedades respiratorias o vasculares pulmonares en fase terminal. Aunque el primer trasplante pulmonar en humanos lo realizó James Hardy, de la Universidad de Mississippi, en 1963 (13), el éxito no llegó hasta los años 80, gracias al refinamiento en la técnica quirúrgica y al advenimiento de la ciclosporina como tratamiento inmunosupresor (14). Desde entonces, el número de trasplantes pulmonares se ha incrementado de forma exponencial (Figura 1) (4).

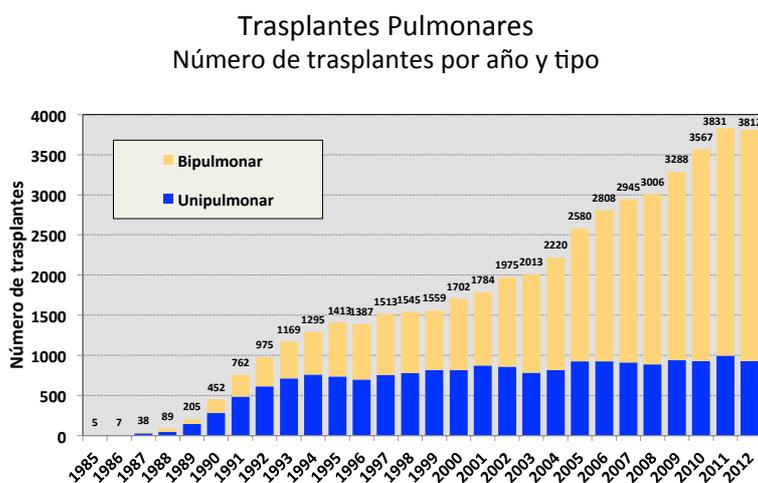


Figura 1: Número de trasplantes pulmonares y cardiopulmonares realizados cada año en el mundo, desde 1985 hasta el último año del registro (2012). Para cada año se muestran los trasplantes realizados en función del procedimiento (unipulmonar o bipulmonar) Adaptada del registro internacional de trasplante de pulmón (ISHLT, International Society for Heart and Lung Transplantation) (4).

La EPOC constituye la principal indicación a nivel mundial, de manera que es responsable de aproximadamente 1/3 de todos los trasplantes pulmonares en la actualidad (4). La segunda indicación es la Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa (EPID), representando un 23% de las indicaciones de trasplante pulmonar (4). En España, la EPOC y la EPID suponen más del 60% de las indicaciones (15). La tercera indicación por frecuencia es la FQ (16%) (4). Otras indicaciones menos frecuentes son

la hipertensión pulmonar idiopática (HTAP) (2%), el enfisema por déficit de α 1-antitripsina (7%), la sarcoidosis (3%), las bronquiectasias no FQ (3%), o la linfangioleiomiomatosis (1%) (4). En la Figura 2 se muestra la evolución de las indicaciones de trasplante pulmonar en el mundo, según los datos del registro internacional.

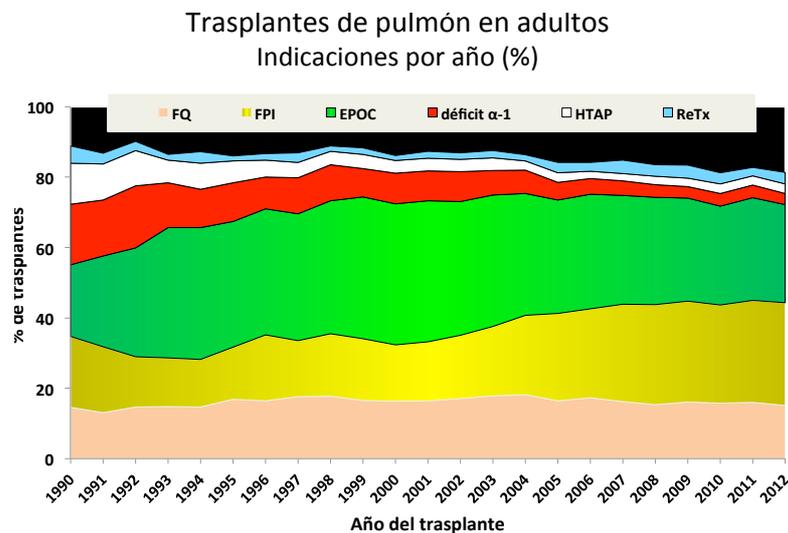


Figura 2: Evolución de las principales indicaciones de trasplante pulmonar en el mundo a lo largo del tiempo. CF: Fibrosis Quística; FPI: Fibrosis Pulmonar idiopática; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; déficit α 1: déficit α 1 antitripsina; HTAP: Hipertensión pulmonar idiopática; ReTx: retasplante. Adaptada del registro internacional de trasplante pulmonar (ISHLT: International Registry for Heart and Lung Transplantation) (4).

A pesar de los cambios introducidos en la selección de los candidatos a trasplante pulmonar, el refinamiento en la técnica quirúrgica, y las mejoras en los cuidados perioperatorios, los resultados siguen siendo inferiores respecto al resto de trasplantes de órganos sólidos (4). Este hecho se podría explicar, en parte, por aspectos inherentes al trasplante pulmonar, como son la escasez de donantes pulmonares válidos, la alta prevalencia de disfunción del injerto, o el rechazo crónico. Se estima que sólo el 15-25% de donantes multiorgánicos proporciona pulmones óptimos para el trasplante, comparado con el 88% que se objetiva con el hígado o el riñón, o el 30% de corazón (16). Esta discrepancia se explica en parte por la especial vulnerabilidad del pulmón a sufrir daño en el proceso de muerte encefálica y posibles eventos asociados al mismo, tales como el traumatismo craneoencefálico, episodios de broncoaspiración, el daño pulmonar asociado a la ventilación mecánica, o el edema pulmonar neurogénico (17). Tanto las causas de la muerte del donante (por ejemplo, el traumatismo craneoencefálico), como las consecuencias de la muerte encefálica (broncoaspiración, edema) pueden desembocar en un empeoramiento de la función

pulmonar (18). Todos los factores no inherentes *per se* al donante pulmonar (como son la edad o el tabaquismo), sino adquiridos como resultado del traumatismo (contusión, inestabilidad hemodinámica, edema neurogénico) o secundarios al manejo médico del donante en la unidad de cuidados intensivos (transfusiones de hemoderivados, sobrecarga hídrica, ventilación mecánica, atelectasia, neumonía por aspiración) son susceptibles de intervención, de forma que puedan recuperarse para el trasplante donantes que inicialmente fueron considerados como no óptimos (19, 20). Respecto a la influencia de la causa de la muerte del donante en la función del injerto se han publicado resultados contradictorios (21, 22). Según los datos del registro internacional de trasplante cardiaco y pulmonar (ISHLT), la causa de la muerte del donante no influye en la mortalidad al año del trasplante, pero aquellos receptores de donantes fallecidos por anoxia tienen mayor riesgo de mortalidad a los 5 años (23).

La posible influencia del intervalo de tiempo existente entre la muerte encefálica y la extracción de los órganos del donante ha recibido poca atención de la comunidad científica. El grupo de Newcastle publicó un modelo experimental de trasplante pulmonar en ratas, comparando los resultados entre la extracción temprana y la extracción tardía tras la muerte encefálica (24). Los autores observaron que la extracción tardía se asociaba a menor daño pulmonar que la extracción temprana, proponiendo un papel dominante del daño hemodinámico inicial en la severidad del daño por isquemia-reperfusión del órgano (24). Más recientemente, el grupo de Lovaina ha demostrado que la extracción pulmonar después de periodos superiores a 10 horas tras la muerte encefálica se asocian a un incremento en la supervivencia, sugiriendo así que la “calidad” del injerto pulmonar podría mejorar mientras que el órgano se recupera del daño asociado a la muerte encefálica (25).

Se han propuesto una serie de medidas para expandir el pool de donantes pulmonares. Una de ellas se basa en las campañas de educación pública y concienciación ciudadana. Cabe reseñar que España figura entre los países con la tasa de donación de órganos más elevada del mundo (35,8 por millón de habitantes) (15). Sin embargo, la tasa de trasplantes pulmonares realizados en España (5,6 por millón de habitantes) se compara negativamente con la de otros países europeos, tales como Austria (15,61 por millón de habitantes) o Bélgica (9,01 por millón de habitantes) (<http://www.eurotransplant.org>, acceso Junio 2015).

Otra medida que ha tenido como resultado en un incremento desde un 21% hasta un 57% en la tasa de pulmones ofertados, y de un 11,1% hasta un 25,5% en la tasa global de injertos pulmonares extraídos, ha sido el manejo agresivo del potencial

donante multiorgánico (19). Otras estrategias como el trasplante pulmonar de donante vivo (26), la donación en asistolia (27) o la perfusión pulmonar exvivo (28), pueden incrementar también el número de injertos pulmonares disponibles para trasplante. Ante la desesperada necesidad de incrementar el pool de donantes, los centros trasplantadores han optado por relajar los criterios de selección de los donantes, al obtenerse resultados aceptables a corto plazo (29-31).

La disfunción primaria del injerto (en inglés, Primary Graft Dysfunction-PGD) es un síndrome de daño pulmonar agudo que tiene lugar en las primeras 72 horas tras el trasplante pulmonar (32). Supone la principal causa de muerte en los primeros 30 días, siendo responsable del 25% de los fallecimientos en este periodo (4). Además, la disfunción del injerto en su grado más severo se ha asociado específicamente con la aparición de rechazo crónico del injerto o disfunción crónica del injerto, que se manifiesta en forma de síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) (33). El BOS es la principal causa de muerte después del primer año del trasplante, suponiendo un 40% de todos los fallecimientos (4). Se estima que la incidencia de BOS alcanza el 50% a los 5 años del trasplante, siendo el principal factor limitante de la supervivencia a largo plazo (34).

3. Cáncer de pulmón

3.1. Epidemiología

El CP continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer en el mundo (35). Así, se estima que es responsable de más de un millón de fallecimientos al año, lo cual supone el 17,6% de las muertes por cáncer (35). Globalmente, el CP supera en mortalidad a los siguientes tres cánceres más prevalentes juntos (colon, mama y próstata), siendo además el principal contribuyente de nuevos casos de cáncer diagnosticados (36). Desde el año 1985, el CP es el tipo de cáncer más frecuente en el mundo, en términos tanto de incidencia como de mortalidad (35). Contrariamente a lo que ha sucedido con muchos otros cánceres como el de mama o el de próstata, en los que la supervivencia se ha visto incrementada de forma significativa, la supervivencia global a los 5 años del CP ha experimentado pocos cambios en las últimas 3 décadas, permaneciendo en cifras tan bajas como del 11-15% (37, 38).

3.2. Etiología

La aparición del CP se debe a los efectos conjuntos de la exposición a los factores de riesgo unido a la susceptibilidad individual del sujeto a dichos factores. Aunque se han identificado varios agentes etiológicos del CP, la causa principal es el

tabaquismo, siendo responsable de alrededor del 80-90% de los casos (39). El tabaco incrementa 20 veces el riesgo de desarrollar CP, asociándose a los 4 subtipos principales (adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma microcítico y carcinoma de células grandes) (40).

3.3. Clasificación histológica

El término CP o carcinoma broncogénico se refiere al tipo de neoplasia que se origina a partir de las células del epitelio respiratorio de la vía aérea o del parénquima pulmonar. El 95% de los casos corresponde a 2 categorías principales, claramente opuestos en cuanto a la forma de presentación clínica, diseminación metastática y respuesta al tratamiento: el carcinoma microcítico de pulmón, o cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP); y el carcinoma no microcítico de pulmón, o cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (41).

El CPCP representa la variante más agresiva, derivándose de células con fenotipo neuroendocrino, y supone el 10-15% de todos los casos de cáncer de pulmón (42). La supervivencia a los 5 años es inferior al 10% (43). El 85% de los casos restantes de CP corresponden al CPCNP, el cual se subdivide a su vez en otros 3 subtipos histológicos predominantes: adenocarcinoma, carcinoma epidermoide o escamoso, y carcinoma de células grandes. El carcinoma epidermoide supone el 20-30% de los CPCNP (42), relacionándose con el hábito tabáquico en el 90% de los casos. El adenocarcinoma representa el 30-40% del CPCNP, siendo actualmente el subtipo más frecuente de CP en muchos países (44). El tercer tipo predominante de CPCNP corresponde al carcinoma de células grandes, y supone un 5%-10% de todos los CP [http://ser.cancer.gov/csr/1975_2012/ (acceso Junio 2015)]. En la Figura 3 se muestra un esquema de los principales subtipos histológicos del carcinoma broncogénico, especificándose su frecuencia en forma de porcentaje.

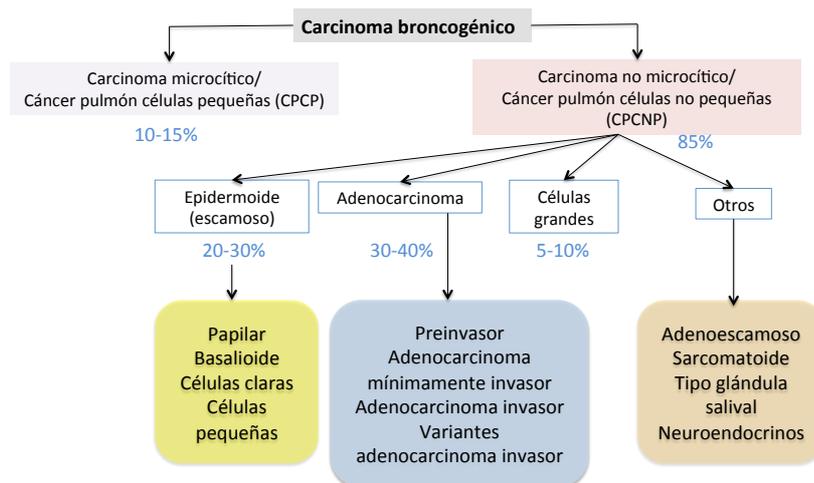


Figura 3: Clasificación histológica de los principales tipos de cáncer de pulmón. Se incluye la última clasificación del adenocarcinoma. CPCP: Carcinoma de pulmón de células pequeñas. CPCNP: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

3.4. Manifestaciones clínicas y formas de presentación

El hecho de que la mayoría de pacientes con CP presentan una enfermedad avanzada al momento del diagnóstico refleja en gran medida la agresividad biológica de esta neoplasia, que habitualmente no produce síntomas hasta que causa metástasis a distancia (45). Entre los síntomas debidos al crecimiento intratorácico del tumor destacan, por orden de frecuencia, la tos (50-75%) (46), la hemoptisis (25-50%) (47), el dolor torácico (20%) (48), y la disnea (25%) (46); menos frecuentes son la disfonía (49), el derrame pleural (50), el síndrome de vena cava superior (51), o el síndrome de Pancoast. Respecto a la diseminación a distancia, se estima que entre 1/3 y el 50% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (52). Los órganos más frecuentemente afectados son el hígado (53), el esqueleto óseo (54), las glándulas suprarrenales (55) y el cerebro (56).

3.5. Diagnóstico, estadificación TNM

La clasificación anatómica del CP como TNM-estadios es crítica a la hora de definir subgrupos de pacientes con pronóstico y estrategia terapéutica similar, y comparar resultados entre distintos ensayos clínicos, puesto que el estadio tumoral TNM al diagnóstico es el factor que posee mayor impacto en la supervivencia a largo plazo (57). La 7ª Edición del TNM (T=Tumor; N=Node, ganglio; y M=Metástasis) elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer) en 2009 es la que está vigente en la actualidad (58-61). Las Tablas 1-3 muestran la clasificación TNM del cáncer de pulmón en su 7ª edición, vigente en la actualidad.

Tumor primario (T)	Descripción
Tx	Tumor primario que no puede ser evaluado, o se demuestra en citología de esputo o lavado bronquial con imágenes y endoscopia negativas.
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por tejido pulmonar o pleural visceral, sin evidencia de invasión proximal al bronquio principal en la fibrobroncoscopia.
-T1a	-Tumor ≤ 2 cm en su diámetro mayor
-T1b	-Tumor > 2 cm, pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
T2	Tumor > 3 cm, pero ≤ 7 cm en su diámetro mayor, o tumor con cualquiera de las siguientes características: afecta al bronquio principal, se encuentra a 2 cm o más de la carina; invade la pleura visceral; está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar, pero no afecta al pulmón entero.
-T2a	-Tumor > 3 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor
-T2b	-Tumor > 5 cm, pero ≤ 7 cm en su diámetro mayor
T3	Tumor > 7 cm o de cualquier tamaño que invade directamente una de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor que se encuentre a menos de 2 cm de la carina, pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero; o existencia de nódulo(s) en el mismo lóbulo.
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo"s" en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.

Tabla 1: Estadificación del cáncer de pulmón, 7ª edición del TNM (2010). Tumor primario (T). Adaptada de la 7ª Edición del TNM de pulmón, elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer) en 2009. (58).

Ganglios linfáticos (N)	Descripción
Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N0	Sin afectación de los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis ganglionares peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales, incluyendo la afectación por extensión directa de los ganglios intrapulmonares.
N2	Metástasis ganglionares mediastínicas homolaterales y/o subcarinales.
N3	Metástasis ganglionares mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas ipsilaterales y contralaterales o supraclaviculares.

Tabla 2: Estadificación del cáncer de pulmón, 7ª edición del TNM (2010). Ganglios linfáticos regionales (N). Adaptada de la 7ª Edición del TNM de pulmón, elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer) en 2009 (59).

Metástasis (M)	Descripción
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
M0	Ausencia de metástasis a distancia.
M	Existencia de metástasis a distancia
-M1a	-Existencia de nódulo(s) en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales; o derrame pleural o pericárdico maligno
-M1b	-Existencia de metástasis a distancia (extratorácicas).

Tabla 3: Estadificación del cáncer de pulmón, 7ª edición del TNM (2010). Metástasis a distancia (M). Adaptada de la 7ª Edición del TNM de pulmón, elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer) en 2009 (61)

3.6. Tratamiento, supervivencia

Ante todo paciente con sospecha de CP, los objetivos de la evaluación inicial se basan en confirmar la malignidad de la lesión, para poder obtener un diagnóstico histológico y, con ello, diferenciar básicamente entre los 2 subtipos principales (CPCP

vs CPCNP); determinar el estadio tumoral; y corroborar la situación funcional del paciente. Actualmente, la cirugía de resección pulmonar con intencionalidad curativa constituye la modalidad terapéutica que proporciona la mayor probabilidad de supervivencia a largo plazo, cuando el tumor es detectado en un estadio inicial (I y II) (62). Desgraciadamente, la mayoría de pacientes presentan al diagnóstico un estadio tumoral avanzado (III ó IV) (52), siendo en estos casos el tratamiento sistémico basado en quimioterapia y/o radioterapia el que proporciona mayor beneficio (63). La Tabla 4 representa los diferentes estadios TNM y sus posibles combinaciones en función de la presencia o no de metástasis ganglionares o sistémicas. En cada estadio se muestra la supervivencia esperada, empleando los datos de la 7ª edición del TNM.

T y M	Subcategoría	N0	N1	N2	N3
T1	T1a (≤2 cm)	IA (50-73%)	IIA (36-46%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
	T1b (>2-3cm)	IA (50-73%)	IIA (36-46%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
T2	T2a (>3-5 cm)	IB (43-58%)	IIA (36-46%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
	T2b (>5-7 cm)	IIA (36-46%)	IIIB (25-36%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
T3	T3 (>7 cm)	IIIB (25-36%)	IIIB (25-36%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
	T3 (invasión)	IIIB (25-36%)	IIIA (19-24%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
	T3 (nódulos mismo lóbulo)	IIIB (25-36%)	IIIA (19-24%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)
T4	T4 (extensión)	IIIA (19-24%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)	IIIB (7-9%)
	T4 (pulmón ipsilateral)	IIIA (19-24%)	IIIA (19-24%)	IIIB (7-9%)	IIIB (7-9%)
M1	M1a (derrame pleural)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)
	M1a (pulmón contralateral)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)
	M1b (a distancia)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)	IV (2-13%)

Tabla 4: Grupos de estadificación del cáncer de pulmón en función del descriptor TNM y sus subcategorías correspondientes. Entre paréntesis se muestra la supervivencia esperada a los 5 años del diagnóstico para cada estadio. Adaptada de la 7ª Edición del TNM de pulmón, elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer) en 2009.

3.7. Marcadores tumorales en el cáncer de pulmón

Dada la pobre supervivencia actual del CP, y la evidencia existente de que el diagnóstico precoz de la enfermedad reduce la mortalidad, en los últimos años ha cobrado especial interés la búsqueda de biomarcadores. Hasta ahora, los biomarcadores moleculares del CP se han clasificado en los siguientes tipos:

- a) *Mutaciones ADN somático*: Se han descrito mutaciones en cromosomas (3p, 9p21, 12p, 17p13, 13q) tales como pérdida de heterocigosidad, traslocaciones, deleciones y mutaciones puntuales (64, 65) .
- b) *Rutas del desarrollo y diferenciación pulmonar*: Recientemente se ha sugerido que el CP se originaría a partir de células pluripotenciales capaces de diferenciarse a uno o varios subtipos histológicos, de tal manera que la carcinogénesis pulmonar vendría determinada por la activación de genes

- transcripcionales y/o eventos represores que resumirían el desarrollo embrionario pulmonar (66, 67).
- c) *Alteraciones en el número de copias y reordenación del ADN*: La inestabilidad genómica es un hallazgo característico en el CP, al igual que en otros tumores sólidos (68). Los cambios más frecuentes en el CP son la aneuploidía, la pérdida alélica en 3p, 4q, 9p y 17p, y la ganancia en 1q, 3q, 5p y 17q (69-71).
 - d) *Metilación*: Los genes más comúnmente metilados en el CP son *CDKN2A*, *FHIT*, *APC*, *p16*, y *RASSF1A* (72-75).
 - e) *Micro-ARN*: En el caso del CP se han encontrado diferencias netas en cuanto a la expresión de miRNA en muestras de tumores respecto al tejido sano adyacente (76).
 - f) *Angiogénesis y el microambiente tumoral*: La angiogénesis es un proceso clave del cáncer, esencial para que un tumor de tamaño microscópico pueda expandirse y ser macroscópico y con relevancia clínica. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) se encuentra frecuentemente sobreexpresado en el CP y se asocia a mal pronóstico (77, 78), de modo que su inhibición es una importante diana terapéutica.
 - g) *Activación de oncogenes y rutas crecimiento celular*: En el CP, se han descrito la activación de numerosos genes como son *EGFR*, *ERBB2*, *MYC*, *KRAS*, *MET*, *CCND1*, *CDK4*, *MET*, la proteína de fusión *EML4-ALK*, y *BCL2*. (79, 80)(81-83). Cabe destacar la activación de la ruta RAS/RAF/MEK/MAPK, la cual ocurre hasta en un 20% de los CP (sobre todo, adenocarcinomas) (84), la familia de protooncogenes MYC (*MYC*, *MYCN* y *MYCL*) (85), o la activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR (86).
 - h) *Genes supresores de tumores y rutas de señalización inhibitorias*: Se han descrito en el CP numerosos genes supresores de tumores que se presentan en estado inactivo, destacando *TP53*, *RB1*, *STK11*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* y *PTEN* (87-92). Son las mutaciones que inactivan p53 las más frecuentes, de modo que el gen 17p13 muestra a menudo una delección de un alelo y una mutación inactivadora del otro (93-95).
 - i) *Células madre*: Cada vez existe más evidencia a favor de su existencia en tumores sólidos, incluidos el CP (96-98). (99). Se cree que las células madre tumorales presentan una mayor resistencia a los fármacos citotóxicos y a la radioterapia que el resto de células del tumor (100, 101).

- j) *Metástasis y transición epitelial-mesenquimal (EMT)*: En el CP, los marcadores mesenquimales y los inductores de EMT (Vimentina, Twist y Snail) han sido descritos como importantes factores pronóstico (102-104).
- k) *Activación de la telomerasa*: La activación de la enzima elongadora del telómero en las células premalignas previene la pérdida de puntos críticos de la porción final del telómero, siendo esencial para la inmortalidad celular (105). La telomerasa se encuentra activada en más del 80% de las células del CPCNP y en prácticamente el 100% del CPCP (106, 107)(108).

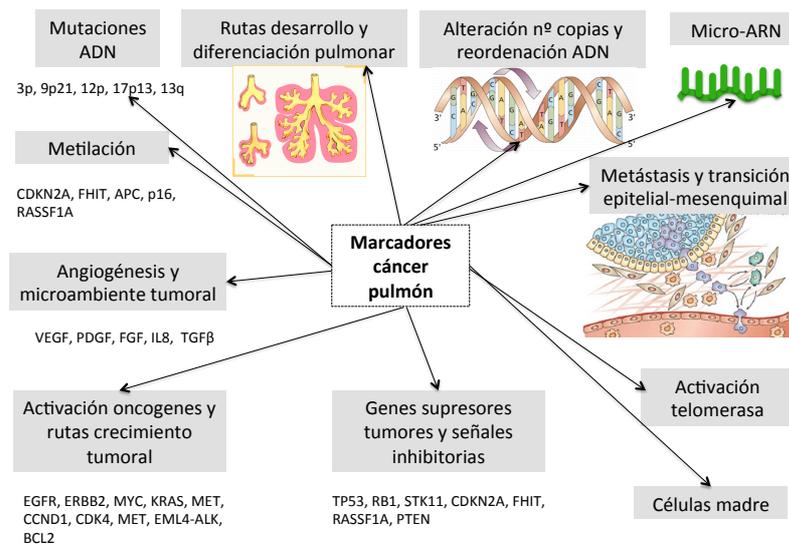


Figura 4: Esquema de los diferentes marcadores tumorales en el cáncer de pulmón.

4. SIAH2 (Seven *in absentia* homolog-2)

Las proteínas SIAH (seven in absentia homolog) son E3 ubiquitin-ligasas con dominio RING (Really Interesting New Gene) finger. Estas proteínas participan en la degradación de proteínas por poliubiquitinación por el proteasoma (109-111). Hace 2 décadas se descubrió el primer miembro de la familia, denominado *seven in absentia* (*sina*), en *Drosophila melanogaster* (112, 113). Se identificó que *sina* tenía un papel crítico en el correcto desarrollo del fotoreceptor R7 de *Drosophila*. Posteriormente se demostró que *sina* era responsable de la degradación proteasomal de un represor transcripcional, siendo un evento celular clave en el desarrollo ocular de la mosca (111). Más adelante, se aislaron por primera vez los homólogos de *sina* en ratón (*Siah*), evidenciándose su alta homología entre especies (114). Se han identificado 3 genes murinos de *Siah*, *Siah1a*, *Siah1b* y *Siah2*, que codifican para 3 proteínas SIAH diferentes (115). Por el contrario, en humanos la familia de proteínas SIAH está formada por sólo 2 subunidades (SIAH1 y SIAH2), productos de 2 genes diferentes (109-111, 116). Ambas proteínas muestran un 77% de homología entre ellas y

comparten el 96-98% de aminoácidos con las de ratón (117). Además, *Sina* está muy conservada en mamíferos, de forma que la homología entre *Sina* y SIAH es del 85% respecto al residuo carboxi-terminal de 270 aminoácidos (114, 116).

La función mejor caracterizada de la ubiquitina (Ub) es mediar la degradación proteica por el proteasoma, lo cual se produce a través de la adición de cadenas de poli-Ub a las proteínas diana (118). La maquinaria de la ubiquitinación es considerada en la actualidad una prometedora diana terapéutica del cáncer, especialmente porque sus componentes son enzimas potencialmente susceptibles de ser moduladas por fármacos. Prueba de ello es la eficacia clínica de algunos compuestos inhibidores del proteasoma como el bortezomid en algunos tipos de cáncer como el mieloma múltiple o el linfoma de manto (119). El proceso de ubiquitinación es una cascada jerárquica en la que 3 tipos de enzimas (E1, E2 y E3) actúan secuencialmente para promover la transferencia de Ub a los sustratos. La familia de proteínas E3 Ub ligasas son las que poseen especificidad de sustrato. Existen 2 moléculas principales que llevan a cabo esta función: las E3 ligasas tipo HECT, con actividad E3 ligasa intrínseca, que catalizan de forma directa la transferencia de Ub a los sustratos; y las E3 ligasas tipo RING, que actúan como adaptadores específicos, uniéndose a enzimas E2 y sus sustratos, permitiendo así que las enzimas E2 catalicen la transferencia de Ub (120).

4.1. ***Estructura y función***

A nivel estructural, la familia de proteínas SIAH posee un extremo N-terminal con variabilidad en 40-80 residuos de aminoácidos, pero sin embargo está altamente conservada en el extremo C-terminal (de unión a sustrato) y en el anillo RING, que es el dominio catalítico (114). En mamíferos, SIAH2 es una proteína dimérica de 324 aminoácidos. Como E3 ubiquitin-ligasa, SIAH2 recibe ubiquitina en forma de tioéster desde una enzima E2 conjugadora de ubiquitina al dominio RING finger, desde el cual la transfiere posteriormente a sus sustratos. En el extremo C-terminal, presenta dos estructuras en dedos de zinc y el dominio de unión a sustrato (SBD, substrate-binding domain). En la Figura 5 se representa la estructura de SIAH2.



Figura 5: Estructura de SIAH2. En mamíferos, la proteína está constituida por 324 aminoácidos. Posee un dominio RING en el extremo N-terminal, que comprende los aminoácidos 80 al 115, al cual se unen las proteínas E2 de conjugación de ubiquitina; 2 estructuras de dedos de zinc, entre los aminoácidos 133 y 193; y un dominio de unión a sustrato (SBD), entre los aminoácidos 130 y 322.

La estructura en cristal del dominio de unión a sustrato es homóloga al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF) (121), habiéndose demostrado posteriormente que SIAH2 es un regulador de la señalización TRAF2, mediante la degradación de TRAF2 (122).

SIAH2 ejerce su actividad como E3 ubiquitin-ligasa directamente, mediante su interacción con sustratos (123, 124), o bien a través de su unión a proteínas adaptadoras y proteínas que interaccionan con SIAH tales como SIP (SIAH interacting protein) o PHYL (phyllopod-link proteins) (125, 126). Se han descrito gran variedad de sustratos de SIAH2, los cuales regulan importantes rutas de señalización celular. Entre los sustratos de SIAH2 destacan PML, TRAF2, PPAR, AKAP121, HDAC3, DCC, b-catenina, HIPK2, y la familia de prolin-hidroxilasas reguladoras de hipoxia (PHDs) (122, 123, 125, 127-132). Entre las funciones descritas de SIAH2 destacan la respuesta al daño en el ADN, la regulación de la apoptosis, la ruta de hipoxia, el control de la carcinogénesis y ciclo celular, la transcripción y la señalización celular, la señalización de estrógenos, la inflamación y la señalización RAS (133).

4.2. Expresión y localización

SIAH2, el gen que codifica SIAH2, se localiza en el cromosoma 3q25, y presenta una homología del 76% con *sina* (116). La proteína tiene un peso de 36 KDa y 324 aminoácidos. *Siah2* se expresa a nivel de ARNm tanto en tejido embrionario como en tejidos de ratón adulto, aunque alcanza sus mayores concentraciones en el epitelio olfatorio, la retina, el cartílago en proliferación del hueso en desarrollo (114). En humanos, *SIAH2* se expresa a nivel de ARNm en la mayoría de tejidos (116). En tumores, se ha detectado una expresión de SIAH2 en la práctica totalidad de los tumores. A nivel celular, aunque SIAH2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, las formas fosforiladas de la proteína se localizan exclusivamente en el núcleo y el área perinuclear, de modo que la función de SIAH2 se relaciona con proteínas localizadas en esta zona de la célula (134).

4.3. Regulación

La expresión de SIAH2 se encuentra regulada tanto a nivel de ARNm, como de proteína mediante auto-ubiquitinación, mientras que la regulación de su actividad se realiza a través de su unión a diferentes proteínas (125, 129, 135). Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de la actividad de SIAH2 por modificaciones traslacionales. En ratones, *Siah2* es fosforilada por p38MAPK, lo cual incrementa su capacidad de degradar PHD3 (134). En humanos, HIPK2 y DYRK2, miembros de la familia de quinasas DYRK (dual-specificity tyrosine-regulated kinases), fosforilan

SIAH2, modificando así su actividad (136, 137). Existen también varios péptidos con capacidad de modificar la actividad de SIAH2 (138, 139). Pero, hasta ahora, sólo un compuesto ha demostrado ser capaz de modificar tanto los niveles de SIAH2 como su actividad, y es la vitamina K3, mediante un mecanismo independiente de redox (140). Por otra parte, se ha demostrado que la enzima USP13 posee capacidad de desubiquitinar, de forma que aumenta la estabilidad de SIAH, puesto que reduce su capacidad de degradación tanto de sí misma como de sus sustratos PHD3 y Sprouty2 (141). Otro regulador de SIAH2 identificado es la quinasa Src, que es capaz de activar SIAH2 a través de la fosforilación de tirosinas (124).

4.4. SIAH2 y Cáncer

El papel de las proteínas SIAH en el cáncer es controvertido. Actualmente, los estudios que relacionan la expresión de SIAH con el desarrollo de cáncer en humanos son escasos y, además, presentan resultados contradictorios en cuanto a la clasificación de SIAH como oncogén o como gen supresor tumoral. Por una parte, muchos grupos han demostrado un papel oncogénico de SIAH2 en cáncer de mama (142, 143), próstata (144, 145) y hepatocarcinoma (146). Pero, por el contrario, también se ha catalogado a SIAH (especialmente, a SIAH1) como gen supresor tumoral en el cáncer de mama (147), cáncer de estómago (148) y el hepatocarcinoma (149). Esto podría explicarse por la diferencia existente entre ambas subunidades de SIAH, de manera que podrían ejercer roles diferenciales, tal y como ha sido revisado recientemente por Wong y Moller (150). En la Figura 6 se muestran los diferentes roles descritos de SIAH2 en la carcinogénesis. Revisando la literatura, el papel de la proteína SIAH2 en el CP en humanos sólo se ha analizado en profundidad en 2 ocasiones (151, 152). En el primer trabajo, los autores demostraron que SIAH2 desempeña un papel crítico en la patogénesis del CP, abriendo así la posibilidad de inhibir la actividad de SIAH como nueva terapia dirigida (151). Aunque las conclusiones se basaban fundamentalmente en experimentos realizados en líneas celulares, una primera aproximación empleando muestras de tejido evidenció una fuerte asociación entre el incremento en la expresión de SIAH y la proliferación celular tumoral. Sin embargo, la crítica principal a este trabajo radica en que no discriminaba entre las 2 isoformas de la familia, SIAH1 y SIAH2. Además, no se analizó en detalle la expresión de SIAH2 a varios niveles. Recientemente, Muller y cols. han analizado mediante inmunohistoquímica la expresión de SIAH2 en muestras de CBCNP procedentes de 3 cohortes de pacientes diferentes, encontrando mayores niveles de

expresión en el subtipo histológico epidermoide comparado con el adenocarcinoma (152).

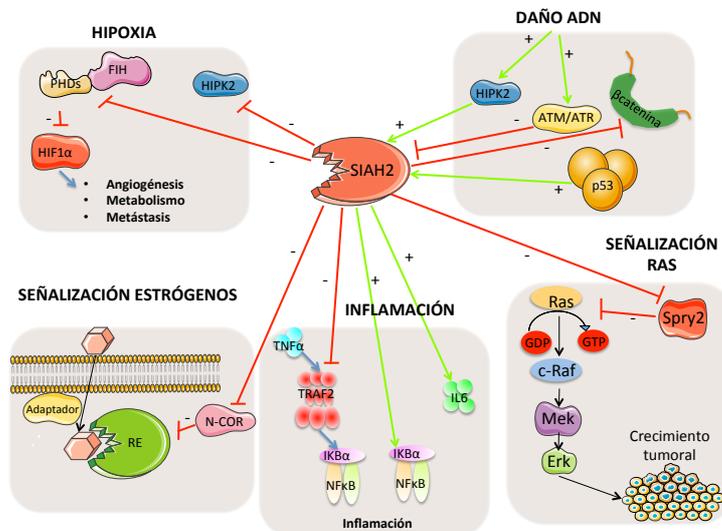


Figura 6: Funciones de Siah2 en la carcinogénesis.

5. Metabolómica

5.1. Conceptos generales

La metabolómica puede definirse como un análisis contextualizado, tanto cuantitativo como cualitativo, de metabolitos endógenos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico como, por ejemplo, biofluidos, células y tejidos (153-155). Los metabolitos son productos intermedios y finales resultantes de procesos metabólicos celulares, y sus niveles pueden reflejar la huella bioquímica del fenotipo completo de un sistema biológico. El campo de la metabolómica integra las demás ciencias “ómicas”, tales como la genómica, la transcriptómica y la proteómica, con los efectos en el entorno del sistema biológico, generando así una visión de “arriba abajo” de la red de genes, proteínas y el entorno, responsables de los cambios fisiopatológicos en el sistema (156). Tal como se muestra en la Figura 7, el metaboloma se encuentra en un nivel inferior respecto al transcriptoma y proteoma. Puesto que el metaboloma de cualquier sistema es dinámico, y se ve afectado por numerosos factores tales como la genética, la susceptibilidad individual, el tiempo y el entorno, la mayor ventaja de la metabolómica es su habilidad para detectar cambios metabólicos sutiles en el metaboloma, los cuales suceden antes de poder detectarse cambios fenotípicos groseros (157).

El término metabolómica es un concepto amplio que incluye diferentes tipos de análisis, y suele clasificarse en función del número de metabolitos analizados y la relación entre éstos y un metabolito o ruta bioquímica concreta. Una forma de clasificar

los análisis metabolómicos es como *dirigidos* o *no dirigidos*. La *metabolómica dirigida* consiste en el análisis cuantitativo y cualitativo de una lista conocida de metabolitos. Generalmente, se centra en metabolitos pertenecientes a una o varias rutas bioquímicas relacionadas entre sí, y se emplea en experimentos cuyo objetivo es responder a cuestiones bioquímicas específicas. Por el contrario, la *metabolómica no dirigida* es más global, de forma que busca medir el mayor número de metabolitos posible en una muestra determinada (158, 159).

Otra forma de clasificar la metabolómica la divide en 4 tipos de estrategias analíticas (160): a) *Huella metabolómica*, que busca analizar rápidamente los procesos biológicos en función de un conjunto de metabolitos, empleando poca diferenciación o cuantificación, para así generar resultados de forma rápida; b) *Perfil metabolómico*, que estudia de forma cuantitativa y cualitativa un conjunto conocido o desconocido de metabolitos, generalmente relacionados con rutas o procesos metabólicos específicos; c) *Análisis dirigido basado en isótopos*, que se centra en un pequeño grupo de metabolitos correspondientes a una ruta bioquímica, para medir el efecto directo de una única mutación génica; y d) la *Metabolómica*, que se basa en el metaboloma completo de un sistema biológico, incluyendo la medición cuantitativa de el mayor número posible de metabolitos.

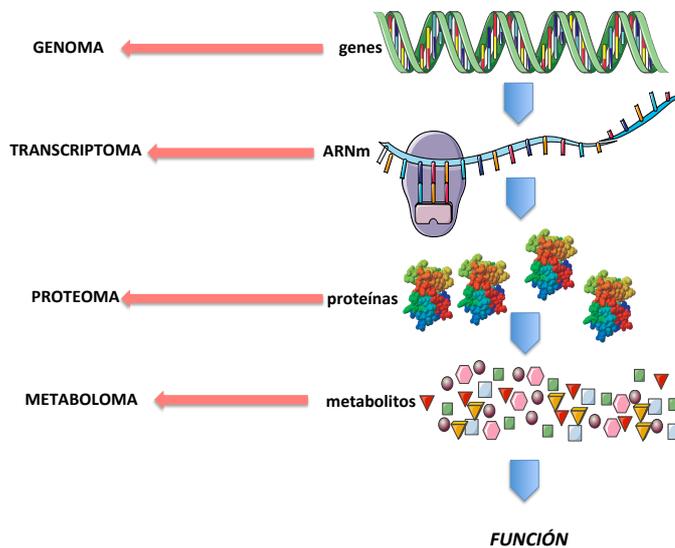


Figura 7: Esquema representativo de la metabolómica.

5.2. Métodos y técnicas de análisis metabolómico

Los pasos básicos para llevar a cabo un experimento de metabolómica comprenden la preparación de la muestra, el análisis, la adquisición de datos y el análisis de los mismos, seguido de la identificación y validación de metabolitos (158, 161). En la actualidad existen 2 tipos de plataformas de detección para los experimentos de metabolómica, la espectrometría de masas y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear, cada una con sus ventajas e inconvenientes en lo que respecta a la preparación de las muestras, la adquisición de datos y el análisis (162). Las muestras que pueden analizarse en metabolómica incluyen células *in vivo* o *ex vivo*, fluidos o tejidos. Biofluidos tales como orina, sangre total, plasma, suero, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, saliva, lavado broncoalveolar o la secreción prostática se han empleado de forma rutinaria en este tipo de estudios, y son, por tanto, los más fáciles de manejar en cuanto a adquisición de datos y manejo de las muestras (154). Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas para usar directamente tejido tumoral, lo cual implica un manejo más dificultoso y cuidadoso de la muestra, debido a la gran heterogeneidad de los tumores y a la posible contaminación con el estroma circundante, así como a su posible degradación (163).

5.3. Aplicación en cáncer

La existencia de cambios metabólicos en el cáncer se conoce desde hace mucho tiempo, de forma que las características del cáncer apuntan hacia una alteración profunda en la bioquímica de las células tumorales (164). Así, para poder mantener su elevada tasa proliferativa, las células tumorales *bypasean* o *downregulan* determinados procesos metabólicos y *upregulan* otros. Uno de los primeros cambios existentes en el metabolismo tumoral en conocerse fue el llamado efecto Warburg, por el cual las células neoplásicas incrementan la tasa de respiración anaeróbica aumentando la glicolisis y disminuyendo el ciclo de los ácidos tricarbónicos (165). Actualmente, se presupone que la formación de un tumor es el resultado de la interacción entre factores externos e internos, estimándose que cerca del 80% de los tumores malignos se correlacionan con factores ambientales. Estos últimos llevarían a la alteración de genes y proteínas relacionadas con la carcinogénesis, los cuales se reflejarían como cambios en el metaboloma (164, 166-170). El conocimiento de los cambios metabolómicos que se asocian al desequilibrio entre crecimiento, estasis celular, apoptosis y diferenciación que caracterizan a los tumores es clave para mejorar la detección precoz del cáncer. Dado que las células tumorales poseen una elevada tasa proliferativa, tienen altos requerimientos energéticos, lo cual puede ser

detectado por diferencias en la utilización de glucosa/energía y sus necesidades de oxígeno respecto a las células sanas (164, 166-168). Los productos metabólicos pueden interactuar directa o indirectamente con moléculas diana, influenciando así los riesgos y complicaciones asociadas a determinadas enfermedades, incluido el cáncer (171-173). Puesto que la interacción entre los metabolitos y determinadas dianas es dinámica, el conocimiento acerca de la genética, los factores predisponentes y el grado de exposición a un agente nocivo (fármaco, tóxico o un componente de la dieta) es fundamental para conocer el metaboloma y su uso potencial como predictor y para prevenir cambios fenotípicos precoces (174, 175). El futuro de la metabolómica reside en su habilidad para monitorizar cambios sutiles en el metaboloma, los cuales tiene lugar antes de que pueda detectarse un cambio grosero en el fenotipo, reflejo a su vez de la enfermedad.

La metabolómica se ha empleado para el estudio de diversos tipos de cáncer. Así, Giskeodegard y cols. (176) encontraron una asociación entre el perfil metabólico y la afectación ganglionar axilar en pacientes con cáncer de mama, postulando que los perfiles metabólicos del cáncer de mama podían proporcionar una información muy beneficiosa para planificar el tratamiento y, por tanto, serían una herramienta valiosa para el diagnóstico. Yang y cols. (177) llevaron a cabo estudios de metabolómica en pacientes con carcinoma hepatocelular, encontraron unos cambios significativos en los perfiles metabólicos en las muestras de tumor comparado con el tejido adyacente no tumoral.

5.4. Metabolómica y cáncer de pulmón

El análisis del perfil metabólico que caracteriza al CP está aún en sus etapas más precoces. Hasta la fecha, pocos trabajos han demostrado la existencia de alteraciones en la expresión de determinados metabolitos en muestras de CP. Gottschalk y cols., (178) empleando 3 líneas celulares diferentes de CP con diferentes resistencias a fármacos quimioterápicos, evidenciaron cambios significativos en los niveles de metabolitos tales como colina, lípidos, lactato y glicina, entre otros (178). Otro estudio analizó el perfil metabólico de muestras de carcinoma bronquiloalveolar, después de ser tratado con erlotinib seguido de resección pulmonar (179). Los autores encontraron una asociación entre los diferentes niveles de aminoácidos, fosfocolinas y metabolitos del ciclo de Krebs, con la sensibilidad al erlotinib y la actividad metabólica en la tomografía por emisión de positrones (PET). Más recientemente, se ha publicado un estudio en el que se empleaba cromatografía de gases para evaluar muestras tanto de suero como de tejido tumoral en 7 pacientes

con CP (no microcítico y microcítico) (180). Los autores identificaron 48 metabolitos alterados significativamente en el cáncer de pulmón, así como un subgrupo de metabolitos alterados de forma característica en función del subtipo histológico y el estadio tumoral. Finalmente, otro trabajo que analizó el perfil metabolómico del CP y el de próstata confirmó una gran actividad glicolítica en las muestras procedentes de CP (181).

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

Los objetivos de este proyecto son, por un lado estudiar factores asociados tanto a los donantes pulmonares, como a los receptores de TP, para identificar posibles variables que influyan de forma negativa en la funcionalidad del injerto a corto y largo plazo, así como a la supervivencia del paciente. Igualmente, investigar el papel del SE y la ruta de señalización DYRK2-SIAH2 en la carcinogénesis pulmonar, así como analizar mediante metabolómica las diferencias en los perfiles bioquímicos del cáncer de pulmón en comparación con el tejido pulmonar sano del mismo paciente. Todo esto con el fin de identificar marcadores predictores de funcionalidad del injerto y de supervivencia a largo plazo para el TP, así como marcadores asociados a cáncer de pulmón que puedan servir para desarrollar nuevas dianas terapéuticas. Por tanto, los objetivos específicos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. Examinar las tasas de validez de injertos pulmonares ofertados para trasplante pulmonar a lo largo del tiempo en un programa de trasplante pulmonar de referencia regional. Estudio de los factores identificados como causales del rechazo de pulmones ofertados para trasplante, potencialmente sujetos a intervención, para incrementar la tasa de donantes válidos.
2. Analizar la posible influencia de las características clínicas del paciente en situación de insuficiencia respiratoria terminal, candidato a trasplante pulmonar, en los resultados del trasplante, al recibir un donante óptimo o marginal. Todo ello, con la finalidad de identificar predictores de funcionalidad del injerto y de supervivencia a largo plazo.
3. Investigar el impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia. Comparación con los resultados del trasplante cuando dicha extracción se lleva a cabo más allá de las primeras 24 horas.
4. Creación y conservación de una pequeña colección de muestras criopreservadas de carcinomas broncogénicos, procedentes de pacientes. Estudio de la expresión de los miembros de la ruta de señalización DYRK2-SIAH2 en muestras de pacientes con adenocarcinoma y carcinoma epidermoide pulmonar, y su relación con la clínica patológica y valores pronóstico.

5. Estudio del perfil metabólico de adenocarcinomas y carcinomas epidermoides de pulmón.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN EL TRASPLANTE PULMONAR.

1.1. Población y diseño del estudio

1.1.1. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar

Para analizar la posible influencia de las características clínicas del paciente candidato a trasplante pulmonar en los resultados del trasplante, al recibir un donante óptimo o marginal, se analizaron de forma retrospectiva 365 trasplantes pulmonares realizados de forma consecutiva en el Hospital Universitario Reina Sofía entre Octubre de 1993 y Diciembre de 2012. Se excluyeron del análisis 11 retrasplantes y 1 trasplante combinado cardio-pulmonar. Ocasionalmente se llevaron a cabo procedimientos twinning, de forma que los 2 pulmones de un mismo donante se implantaron en 2 receptores diferentes. Las variables clínicas que se recogieron en el estudio fueron las siguientes:

-*Donante*: Sexo, edad, grupo sanguíneo AB0, PaO₂/FiO₂ en el momento de la extracción, duración de la ventilación mecánica, estancia en UCI, causa de la muerte, historia de tabaquismo, hallazgos de la radiografía de tórax y resultados de la fibrobroncoscopia.

-*Receptor*: a) pre-trasplante: edad, sexo, grupo sanguíneo AB0, indicación trasplante, ventilación mecánica pre-trasplante; b) intraoperatorias: tipo de trasplante realizado (unipulmonar/bipulmonar), necesidad circulación extracorpórea, tiempos de isquemia del primer y segundo injerto; c) post-trasplante: PaO₂/FiO₂ a las 24 horas del trasplante, duración de la ventilación mecánica, episodios de rechazo agudo (totales, en el primer mes, entre el segundo y tercer mes, y más allá del tercer mes del trasplante), el síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS), la mortalidad a los 30 días y la supervivencia.

Los donantes con criterios extendidos (DE) se definieron como aquellos que cumplieron, como mínimo, 2 de los siguientes criterios:

- Edad > 55 años
- PaO₂/FiO₂ < 350 mmHg con PEEP de 5 cmH₂O
- Presencia de infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax

- Presencia de secreciones purulentas en la fibrobroncoscopia
- Tiempos de isquemia superiores a 6 horas (en el trasplante unipulmonar) o superiores a 9 horas en el trasplante bipulmonar
- Historia de tabaquismo superior a 20 paquetes/año.

Se consideró el valor de la presión parcial arterial de oxígeno del donante en el momento de la extracción en lugar del valor de la oferta inicial del órgano. Los donantes con índices de oxigenación por debajo de 300 mmHg, a pesar de un manejo agresivo, no fueron considerados para el trasplante en ningún caso. Los donantes ideales (Donantes óptimos, DO) cumplieron todos los criterios estándar de selección del donante pulmonar (18). Se consideraron como receptores con criterios extendidos (RE) aquellos que cumplieron al menos uno de los criterios siguientes:

- Diagnóstico de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) o Hipertensión arterial pulmonar
- Edad superior a 60 años
- Candidatos en ventilación mecánica antes de la realización del trasplante pulmonar
- Necesidad de circulación extracorpórea durante el trasplante superior a 2 horas

Los receptores óptimos (RO) cumplieron todos los criterios estándar de selección del candidato a trasplante pulmonar definidos por la sociedad internacional (ISHLT) (182). Para el propósito de investigar la influencia de las características de los donantes y receptores en el trasplante pulmonar, se clasificaron donantes y receptores fueron clasificados como óptimos o extendidos, de modo que se crearon 4 grupos: DO, DE, RO y RE. Se llevó a cabo un análisis subsiguiente comparando las 4 posibles combinaciones:

- Grupo 1: DO a RO
- Grupo 2: DO a RE
- Grupo 3: DE a RO
- Grupo 4: DE a RE

Los objetivos principales fueron la mortalidad a los 30 días, la aparición de disfunción primaria del injerto (PGD), la aparición de bronquiolitis obliterante (BOS) y la supervivencia. Los objetivos secundarios fueron la aparición de complicaciones post-trasplante, la necesidad de circulación extracorpórea, la estancia en UCI, y la incidencia de rechazo agudo (RA). Se comparó la mortalidad a los 30 días, la aparición

de BOS, la supervivencia a largo plazo y otros resultados del trasplante en los DO respecto a los DE, en los RO respecto a los RE, y entre los 4 grupos del estudio.

1.1.2. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia

Para este propósito, se revisaron las historias clínicas de 356 pacientes sometidos a trasplante pulmonar de forma consecutiva en el Hospital Universitario Reina Sofía, a lo largo de 17 años. Se excluyeron los donantes fallecidos por causa no traumática (n=220) y los trasplantes (n=11). Un total de 132 pacientes entraron finalmente en el análisis. Se estudiaron 53 (40%) trasplantes unipulmonares, 77 (58%) bipulmonares, 1 trasplante combinado hepato-bipulmonar, y un trasplante combinado cardio-pulmonar (1%). La recogida de los datos se llevó a cabo de forma retrospectiva. Entre las variables que se analizaron del donante se incluyeron el sexo, la edad, el grupo sanguíneo AB0, el índice de oxigenación (PaO_2/FiO_2) en el momento de la extracción, la duración de la ventilación mecánica, la estancia en UCI, la causa de la muerte y el uso de donantes con criterios extendidos (DE). Las variables pre-trasplante del receptor incluidas en el estudio fueron la edad, el sexo, el grupo AB0 y la indicación del trasplante. Entre las variables intraoperatorias del receptor se analizaron el tipo de trasplante realizado, la necesidad de circulación extracorpórea y los tiempos de isquemia del primer y segundo injerto. Las variables postoperatorias analizadas fueron el índice de oxigenación (PaO_2/FiO_2) en las primeras 24 horas, la duración de la ventilación mecánica, los episodios de rechazo agudo (RA) (totales, en el primer mes, entre el 2º y el 3º mes, y después del 3º mes del trasplante), el BOS, la mortalidad a los 30 días y la supervivencia. Los pacientes fueron distribuidos entre el Grupo A, que comprendió aquellos receptores que recibieron pulmones extraídos dentro de las primeras 24 horas de la muerte encefálica del donante; y el Grupo B, en el que se incluyeron los receptores que recibieron pulmones extraídos más allá de las primeras 24 horas después de la muerte encefálica. Se examinó la influencia de la extracción precoz (<24h) o tardía (>24h) en la aparición de disfunción del injerto (PGD), BOS, mortalidad a los 30 días y la supervivencia.

1.2. Evaluación del donante y técnica de extracción y preservación pulmonar

Todos los potenciales donantes ofertados al Programa de Trasplante Pulmonar del Hospital Reina Sofía fueron evaluados por miembros pertenecientes al programa, tras recoger y discutir los datos generales del donante proporcionados por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) tales como la edad, el sexo, el peso, la talla, los diámetros torácicos, la causa de la muerte, los hallazgos de la radiografía de tórax, el índice de oxigenación, la serología y la presencia de comorbilidades. Una vez analizada inicialmente la validez del donante, y la existencia de un receptor potencial para dicho donante, el equipo extractor viajó hasta el hospital donante para evaluar in situ al donante y realizar la extracción en caso de considerarse válido. En alguna ocasión, la evaluación de los donantes la realizó otro grupo trasplantador, que envió los injertos a nuestro centro para realizar el implante (procedimientos *twinning*). En la mayoría de donantes potenciales se llevó a cabo un lavado broncoalveolar (BAL) por el cirujano torácico extractor. En algunos casos no se realizó la fibrobroncoscopia debido a causas técnicas (donantes pediátricos con luz traqueal pequeña, para los cuales se carece de un fibrobroncoscopio de calibre adecuado), a inestabilidad del donante a la llegada del equipo extractor (con lo cual, no se disponía del tiempo necesario para llevar a cabo el procedimiento), o cuando la extracción pulmonar la realizó otro grupo trasplantador que no realizan fibrobroncoscopias en el donante pulmonar de forma rutinaria.

En general, los donantes fueron aceptados para el trasplante si satisficieron los criterios clásicos de aceptación: edad < 55 años, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 300$ mmHg, radiografía de tórax sin infiltrados, tabaquismo inferior a 20 paquetes-año, ausencia de secreciones purulentas o signos de broncoaspiración en la fibrobroncoscopia, y ausencia de anomalías macroscópicas en el momento de la extracción (182). No obstante, en casos seleccionados se aceptaron pulmones de donantes mayores de 55 años, con infiltrados pulmonares poco relevantes, una historia de tabaquismo presumiblemente superior a 20 paquetes-año, secreciones purulentas en la fibrobroncoscopia pero no muy cuantiosas, o con pequeños focos contusivos. Sin embargo, nunca se aceptó para trasplante ningún donante con un índice de oxigenación inferior a 300 mmHg en el momento de la extracción.

La extracción pulmonar se llevó a cabo según la técnica estándar de extracción cardiopulmonar combinada (183). En el momento de la esternotomía media, se le administraron al donante 10 mg/kg de metilprednisolona (Solu-moderin®, Pharmacia & Upjohn, Barcelona, Spain). Una vez liberados el corazón y los pulmones, se heparinizó al donante (300 U/kg). Se canularon la aorta y el tronco de la arteria pulmonar

principal, y se administró 1 mg de prostaglandina E1 (Alprostadil® 500 mcg/ml, Pfizer Manufacturing Belgium NV/SA, Bélgica) directamente a través del tronco principal de la arteria pulmonar, antes de clampar la aorta. Los pulmones fueron perfundidos anterógradamente a través de la arteria pulmonar principal, purgando el líquido de preservación por la orejuela izquierda. A lo largo de todo el periodo de perfusión y extracción, los pulmones se mantuvieron ventilados ($FiO_2 < 1$) y fríos, gracias al llenado de la cavidad torácica con hielo pilé. Al finalizar la perfusión, se extrajo primero el corazón, se ligó y seccionó la tráquea tras aplicar 2 cargas de endograpadora, y se extrajeron los pulmones insuflados. Inmediatamente después de la extracción del bloque, se realizó una segunda perfusión pulmonar con la solución de preservación, por vía retrógrada (a través de las venas pulmonares), para optimizar la preservación pulmonar mediante la perfusión de la circulación bronquial (184). La solución de preservación empleada (60 ml/kg; 4°C, 30 cm H₂O) fue el Eurocollins modificado, hasta el año 2001, y el Perfadex® (Vitrolife, Göteborg, Suecia) desde entonces en adelante.

1.3. Técnica quirúrgica del trasplante pulmonar

En los receptores se realizó un trasplante uni o bipulmonar, a través de una toracotomía posterolateral o una toracotomía anterolateral transesternal (clamshell), respectivamente. Una vez realizada la anastomosis bronquial, se anastomosaron la arteria pulmonar y la aurícula izquierda de forma rutinaria. Se empleó la circulación extracorpórea en caso de que fuera imposible mantener al paciente en ventilación unipulmonar durante la neumonectomía del pulmón nativo o el implante del injerto, en caso de aparición de disfunción del injerto después del implante del mismo, o si el paciente desarrolló inestabilidad hemodinámica en cualquier fase del implante. Al finalizar el trasplante, se realizó una fibrobroncoscopia para examinar el estado de la sutura bronquial y aspirar secreciones y coágulos de la vía aérea.

1.4. Manejo post-trasplante

El régimen inmunosupresor consistió en una triple terapia: ciclosporina o tacrolimus + azatioprina o micofenolato mofetil + corticoides. La administración de metilprednisolona se inició de forma intravenosa en el quirófano (1 gr antes de la reperusión en total, 500 µg por cada pulmón implantado). Inmediatamente después de finalizar el trasplante se inició la administración de ciclosporina (Sandimmun; Novartis, Basle, Suiza) a una dosis suficiente como para alcanzar unos niveles séricos entre

350—400 ng/ml, manteniéndose la administración de metilprednisolona en dosis decrecientes hasta el 4º día post-trasplante, en el que se reemplazó por 1,5 mg/kg/día de deflazacort (Dezacor; Hoechst Marion Roussel, Barcelona, España). La administración de azatioprina (2 mg/kg/día; Imurel®; Medeva Pharma, Madrid, España) se inició a las 48-72 horas del trasplante después de conocer los resultados de los cultivos del donante y del receptor. Sin embargo, algunos pacientes recibieron micofenolato mofetil (2-3 gr/día, Cellcept®; Roche Lab., Inc. Nutley, NJ, Estados Unidos) en lugar de azatioprina. A los pacientes con episodios recurrentes de rechazo agudo, aquellos con toxicidad secundaria a la administración de ciclosporina, y los que desarrollaron bronquiolitis obliterante, se sustituyó el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina por tacrolimus (Prograf®; Fujisawa, Killorglin, Kerry, Irlanda) a dosis suficientes para alcanzar niveles séricos entre 10 y 20 ng/mL.

La administración de antimicrobianos se basó en las sensibilidades antibióticas obtenidas en los cultivos de esputo pre-trasplante del receptor, así como del broncoaspirado del donante. Se realizaron fibrobronoscopias a las 24-48 horas del trasplante, en el momento de extubar al paciente, y posteriormente en caso de existir sospecha clínica de infección o rechazo. No se llevaron a cabo bronoscopias de manera rutinarias más allá de esa fecha.

1.5. Definiciones

La disfunción primaria del injerto (PGD) se definió según los criterios de la Sociedad Internacional de trasplante cardiaco y pulmonar (ISHLT) (32). Para detectar posibles casos con índice de oxigenación bajos en las primeras 24 horas tras el trasplante, susceptibles de mejorar precozmente (daño por reperfusión, edema pulmonar post-trasplante), sólo se seleccionaron aquellos casos en los que persistió bajo el índice de oxigenación, acompañado de infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax, a las 72 horas tras el trasplante (PGD grados 2-3 a las 72h). En la Tabla 5 se muestra la clasificación de la severidad de la disfunción del injerto según los criterios de la ISHLT.

Grado PGD	PaO ₂ /FiO ₂	Infiltrados Rx tórax (edema)
0	>300	Ausente
1	>300	Presente
2	200-300	Presente
3	<200	Presente

Tabla 5: Criterios de definición de la disfunción primaria del injerto (PGD, primary graft dysfunction) según la Sociedad Internacional del trasplante cardíaco y pulmonar (ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation) (32).

El síndrome de Bronquiolitis Obliterante, expresión del rechazo crónico pulmonar, se definió según los criterios de la ISHLT (185). Sólo se consideraron para el análisis los casos de BOS grados 2 ó 3. En la Tabla 6 se muestra el sistema de gradación de la bronquiolitis obliterante de la ISHLT.

Grado BOS	Definición
0	FEV1 > 90% basal y FEV ₂₅₋₇₅ >75% basal
0p	FEV1 81-90% basal y/ó FEV ₂₅₋₇₅ >75% basal
1	FEV1 66-80% basal
2	FEV1 51-65%
3	FEV1 ≤ 50%

Tabla 6: Severidad del Síndrome de Bronquiolitis Obliterante (BOS) tras el trasplante pulmonar. Criterios de la Sociedad Internacional del trasplante cardíaco y pulmonar (ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation) (185).

Las complicaciones de la vía aérea se definieron como la aparición de dehiscencia, estenosis o malacia en la anastomosis bronquial, requiriendo tanto medidas conservadoras como intervención médica (cirugía, dilatación por broncoscopia, desbridamiento, tratamiento con láser o colocación de stents).

1.6. Estudio estadístico

Para analizar la posible influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar, se llevó a cabo un análisis univariante comparando DO con RO; DE con RO; DO con RE y DE con RE. Para investigar el impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia, se realizó un análisis univariante para comparar la influencia de cada variable del donante

en la aparición de disfunción del injerto (PGD), episodios de rechazo agudo, el desarrollo de BOS y la supervivencia a largo plazo. Se determinó la distribución normal de las variables continuas, que se representaron como medias \pm DE (desviación estándar). Para analizar diferencias entre variables categóricas se empleó la χ^2 de Pearson y el test exacto de Fisher. La t de student para muestras no pareadas y el Test de Mann-Whitney se emplearon para comparar medias entre 2 variables cuantitativas de muestras con distribución normal o no normal, respectivamente. Las comparaciones entre variables continuas de los 4 grupos correspondientes a los posibles emparejamientos según el género se llevaron a cabo con el análisis de la varianza y el test de Scheffe. Se analizó y comparó la supervivencia y la supervivencia libre de BOS empleando el método de Kaplan-Meier y el test de log-rank. Las variables continuas se representaron como medias \pm DE (desviación estándar). Las variables categóricas se representaron como proporciones y sus correspondientes intervalos de confianza al 95%. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS v20 Macintosh (SPSS, Inc., Chicago, IL, EEUU).

2. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOGENESIS PULMONAR. ANÁLISIS METABOLÓMICO Y RUTA DE SEÑALIZACIÓN DYRK2-SIAH2.

2.1. Pacientes y muestras.

Se obtuvieron de forma prospectiva muestras de tejido pulmonar procedente de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón intervenidos quirúrgicamente con intencionalidad curativa en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba España) entre Enero de 2011 y Diciembre de 2012. Se obtuvo la autorización del Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía para poder coleccionar, utilizar y almacenar las muestras en el nodo de Córdoba perteneciente al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SAS). Igualmente, se recabó el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio para la cesión de las muestras excedentes del diagnóstico y el mantenimiento del necesario anonimato. Todas las muestras fueron revisadas histológicamente por 2 patólogos expertos en cáncer de pulmón, siendo clasificadas según la clasificación de los tumores pulmonares de la OMS (186). El diagnóstico patológico de las muestras incluidas en el estudio fue de

adenocarcinoma en 36 casos y carcinoma epidermoide en 40. Además del tumor, en todos los casos se obtuvo tejido pulmonar no tumoral adyacente al tumor. Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio habían recibido tratamiento quimioterápico o radioterápico previamente a la intervención quirúrgica

Se estableció un protocolo de envío en fresco de las piezas de resección pulmonar desde el área quirúrgica del Hospital Reina Sofía hasta el Departamento de Anatomía Patológica, en un tiempo inferior a 30 minutos. Una vez recibida la pieza quirúrgica se realizó una selección correcta de los tejidos a partir de los sobrantes para el diagnóstico, lo cual fue llevada a cabo por un patólogo que determinó en cada caso la calidad de muestra y diseccionó las áreas de mayor interés siguiendo los criterios institucionales para la priorización de los estudios (diagnóstico, pronóstico e investigación). En ese momento la muestra fue conservada inmediatamente de tres formas diferentes: una parte fue congelada inmediatamente a -80°C en solución OCT (optimum cutting temperature), otra fue sumergida en líquido de preservación RNA-Later[®] (Sigma, S. Louis-MO, EEUU) y una tercera fue incluida en parafina para realizar estudios convencionales de histología e inmunohistoquímica.

Uno de los puntos más relevantes de la creación y obtención de este material biológico fue poder hacer una relación entre los resultados obtenidos de los análisis básicos y la clínica de los pacientes. Por este motivo, se desarrolló una base de datos conteniendo las variables clínicas más relevantes de los pacientes, de acuerdo con los estándares internacionales actuales (Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón-IASLC), estando cada registro asociado con sus muestras correspondientes de tejido tumoral y sano.

2.2. Análisis histológico

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron en muestras procedentes de tumores pulmonares fijadas en formaldehído y embebidas en parafina. Se analizó la intensidad de la tinción de las células tumorales comparadas con el tejido sano adyacente al tumor. Para ello, se obtuvieron secciones de 5 micras de grosor de las muestras de tumores, y se montaron en cristales. Posteriormente, las secciones se desparafinaron en xilol, y se rehidrataron gradualmente en series de etanol y agua destilada. Se llevó a cabo una tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y el anticuerpo murino anti-SIAH2 24E6H3 (Novus Biologicals[®], Cambridge, Reino Unido) en dilución 1:40, o el anticuerpo policlonal de conejo anti-DYRK2 (AP7534a; Abgent, San Diego, California; EEUU) en dilución 1:50, manteniendo la incubación con el anticuerpo

primario a 4 ° C de temperatura durante toda una noche. Para la recuperación antigénica de las secciones a teñir con los anticuerpos anti-SIAH2 o anti-DYRK2, se incubaron los cristales en vapor (98-100 ° C) durante 30 minutos, con EDTA 1 mM y un pH de 8.0. Para la cuantificación de células positivas para SIAH2 o DYRK2, se inspeccionaron las secciones histológicas con microscopio bajo un aumento de 20 veces. Se adquirieron imágenes representativas, que se almacenaron en un ordenador mediante el software Leyca (firecam 3.2).

La evaluación de la intensidad de la tinción frente a SIAH2 se realizó como sigue: 0, no tinción o tinción muy tenue a nivel citoplasmático en menos del 10% de las células tumorales; 1+, tinción tenue en más del 10% de las células tumorales; 2+, tinción débil-moderada a nivel citoplasmático en más del 10% de las células tumorales; y 3+, tinción citoplasmática muy intensa en más del 10% de las células tumorales. En el caso de DYRK2 se utilizó la escala de evaluación publicada previamente (187). Así, se consideró una tinción 0 ó 1+ como DYRK2 negativa, mientras que un valor de 2+ ó 3+ fue considerado como DYRK2 positiva.

2.3. Extracción de ARN y qRT-PCR

El ARN total fue extraído de las muestras tanto de tejido tumoral pulmonar, como su correspondiente tejido sano adyacente, preservadas en RNALater a -80 ° C. Para ello se seleccionaron fragmentos de tejido de unos 50 mg de peso, y se realizó una homogeneización de las muestras mediante esferas de acero de 5 mm de diámetro en un disgregador TissueLyser LT (Qiagen®). Posteriormente se realizó la extracción del ARN en el equipo QIAcube (Quiagen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante mediante el uso del RNasy® Mini Kit (Qiagen®), realizando una digestión con DNAsa durante el proceso (RNase-free DNase set de Qiagen®), y eluyendo el ARN en un volumen final de 50 µL. La pureza del ARN obtenido se cuantificó inicialmente mediante medida de absorbancia en un NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA; EEUU), para posteriormente ser analizada mediante microchips Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (BIO-RAD, Madrid, España). Sólo se seleccionaron para el estudio aquellas muestras cuyo indicador de calidad del ARN (RNA quality indicator, RQI) dio un valor igual o superior a 9. Igualmente, se descartaron las muestras contaminadas con ADN genómico o ARNt. La retrotranscripción del ARNm a ADNc fue llevada a cabo mediante iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante, empleando 1 µg de ARN total en un volumen de reacción de 20 µL. La amplificación

de los productos retrotranscritos fue realizada mediante el kit iQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de detección iCYCLER (Bio-Rad, Madrid, España), siguiendo el protocolo del fabricante. El programa de amplificación está compuesto por una activación inicial de 15 minutos a 95 ° C seguida de 50 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 95 ° C, un anillamiento de 30 segundos a 61,4°C (para SIAH2), 30 segundos de extensión a 72 ° C y un paso de desnaturalización de 1 minuto a 97 ° C. La eficiencia de amplificación fue validada y normalizada frente a la expresión del gen β -actina, HPRT y la media de ambas (β -actina, HPRT). El cambio de expresión fue calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (188). Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados fueron las siguientes: SIAH2 forward: 5'-CTATGGAGAAGGTGGCCTCG-3'; SIAH2 reverse: 5'-CGTATGGTGCAGGGTCAGG-3'; β -actina forward: 5'-GCTCCTCCTGAGCGCAAG-3'; β actina-reverse: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'; HPRT forward: 5'- ATGGGAGGCCATCACATTGT -3'; HPRT reverse: 5'- ATGTAATCCAGCAGGTTCAGCA -3'). Todos los cebadores fueron adquiridos de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

2.4. Determinación de la expresión de proteínas mediante western blot.

En primer lugar se llevó a cabo una extracción de proteínas de tejido preservado en solución de RNALater a -80 ° C, empleando cantidades similares de tejido tanto de tumor como de su correspondiente tejido sano adyacente. Para ello, un fragmento de tejido de un peso máximo 50 mg fue resuspendido inmediatamente en 300 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 10% NP-40) y suplementado con inhibidores de fosfatasa (500 mM NaF, 200 mM Na_3VO_4) e inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina y PMSF). Tras centrifugar el lisado durante 15 minutos a 4 °C, se mezcló el sobrenadante con tampón de carga SDS 1x (dodecil sulfato de sodio) y, a continuación, se procedió a hervirlo a 95 °C durante 3 minutos. A continuación, las proteínas fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida 8-10% (SDS-PAGE), y transferidas después a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) durante 30 minutos a 20 voltios.

Seguidamente, las membranas fueron incubadas en un tampón TTBS (tampón tris salino con Tween-20 0,1 %) conteniendo leche desnatada disuelta al 5%, para bloquear los sitios de unión inespecíficos, tras lo cual se lavaron 3 veces en TTBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos. Para ello, se sumergieron las membranas en el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la

noche a 4 ° C y agitación suave. Pasado este tiempo, se lavaron las membranas durante 10 minutos con TTBS hasta en 3 ocasiones, añadiendo después el anticuerpo secundario también disuelto en la misma solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo secundario se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante un periodo de 1 hora, también en agitación suave. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se procedió a lavar las membranas de nuevo hasta en 3 ocasiones, para ya revelarlas empleando un sistema de detección de quimioluminiscencia. Las intensidades de señal de SIAH2 obtenidas en los western blots fueron analizadas y cuantificadas empleando el software ImageJ v1.45 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) después de normalizarlas con las intensidades de señal de la β -actina. El anticuerpo anti β -actina (AC-74) fue adquiridos a Sigma-Aldrich. Los anticuerpos anti-SIAH2 (sc-5507) y anti-DYRK2 (sc-66867) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EEUU).

2.5. Modelo de diferenciación a fenotipo epidermoide con células BEAS-2B

Se realizó un modelo *in vitro* de diferenciación de células epiteliales bronquiales a células de carcinoma epidermoide de pulmón. Para ello, se empleó la línea celular BEAS-2B, que corresponde a células del epitelio bronquial humano, y que fueron adquiridas a SIGMA (SIGMA; European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Reino Unido. 95102433). Las células fueron mantenidas en cultivo a 37 ° C y en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, empleando el medio libre de suero LHC-9 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La diferenciación a fenotipo de carcinoma epidermoide de pulmón se logró mediante la incubación de las células en el medio LHC-9 pero enriquecido con un 10% de suero fetal bovino (FBS) durante 7 días. Después de este tiempo, las células fueron lavadas en PBS, centrifugadas, y el pellet fue lisado en buffer NP-40 (20 mM Tris-HCl a pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 10 mM NaF, 0.5 mM ortovanadato de sodio, 10 mg/mL leupeptina, 10 mg/mL aprotinina, 10 mg/mL pepstatina, 1% (v/v) NP-40, y 10% (v/v) glicerol). Una vez centrifugadas, se mezclaron los sobrenadantes con buffer SDS, procediéndose después a analizar la expresión por western blot.

2.6. Metabolómica

Se llevó a cabo un análisis del perfil metabolómico de muestras de tejido pulmonar tumoral (adenocarcinomas y carcinomas epidermoides) y normal procedentes de 70 pacientes (35 adenocarcinomas y 35 carcinomas de células escamosas). El análisis se realizó usando la plataforma de la compañía Metabolon,

empleando para ello muestras preservadas en OCT a -80° C. Las muestras fueron preparadas empleando el sistema MicroLab STAR (Hamilton) y sometidas posteriormente a 2 análisis en paralelo: Ultrahigh performance liquid chromatography-Tandem Mass Spectroscopy (UPLC-MS/MS) en condiciones ácidas y básicas, y Cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS). Los compuestos fueron identificados por comparación con colecciones conocidas previamente pertenecientes a dicha empresa.

2.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico realizado a los resultados de metabolómica se emplearon test de significación estadística y análisis de clasificación. Los test de significación estadística utilizados fueron los siguientes: Test de Welch para comparar 2 medias, la t de student para muestras pareadas, el ANOVA de una vía y de 2 vías para el análisis de la varianza, la correlación de Pearson para medir la asociación lineal entre 2 variables, y el test T^2 de Hotelling. Se consideró un valor de la p inferior a 0,05 como estadísticamente significativo. Como la medición de la intensidad de un metabolito concreto carece en sí mismo de relevancia clínica, siendo el valor importante su medida relativa a la media de la muestra o de la población, se determinó el z-score, también denominado standard score o normal score.

Para los estudios de correlación entre los datos de expresión de SIAH2 y los datos clínicos se emplearon la χ^2 cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher para detectar las diferencias entre variables categóricas. La t de student para muestras independientes se utilizó para comparar medias entre variables cuantitativas, para datos con distribución normal, mientras que, por el contrario, se utilizó el test de Mann-Whitney para los casos en los que no se pudo determinar la distribución original ni la distribución de los estadísticos. Para variables con más de 2 categorías, se empleó el test de Kruskal-Wallis. Con objeto de determinar la relación entre 2 variables continuas, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal. Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar. Las variables categóricas se expresan como porcentajes y proporciones. Las diferencias cuyo valor de P fue inferior a 0,05 fueron consideradas como estadísticamente significativas. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS (SPSS 20.0 for Mac: SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN EL TRASPLANTE PULMONAR

1.1. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar

Se realizaron un total de 365 trasplantes pulmonares. Hubo 136 (37,2%) donantes extendidos (DE) comparado con 229 donantes óptimos (DO). Respecto a los procedimientos realizados, se llevaron a cabo 214 trasplantes bipulmonares (58,5%) y 151 unipulmonares (41,5%). Respecto a los DE, 44 tenían una historia de tabaquismo superior a 20 paquetes-año (en el 17% de los donantes el antecedente de tabaquismo no estaba disponible), 25 eran mayores de 55 años, 24 tenían una $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 300 y 350 mmHg, 66 tenían una radiografía de tórax anormal, 168 tenían una broncoscopia patológica, en 61 el tiempo de isquemia del primer injerto fue superior a 6 horas, y el del 2º injerto superior a 9 horas. El criterio extendido más frecuente entre los receptores (RE) fue el diagnóstico de fibrosis pulmonar o hipertensión pulmonar (n=107), seguido de la edad superior a 60 años (n=60), la ventilación mecánica pre-trasplante (n=40) y el uso de circulación extracorpórea durante el procedimiento por más de 2 horas (n=13).

1.1.1. Donantes extendidos frente a donantes óptimos

El análisis comparativo de los resultados del trasplante en función del estado del receptor (DE vs. DO) se muestra en la Tabla 7. La distribución por sexos fue similar en ambos grupos de donantes. Debido a su consideración como criterio extendido, los DE tenían más edad, menor $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, tiempos de isquemia más prolongados y fueron ventilados de forma más prolongada (Tabla 7). Los pulmones procedentes de DE se trasplantaron más frecuentemente en receptores de más edad (media edad receptor 45 ± 16 años) respecto a aquellos que recibieron pulmones de DO (40 ± 17 años) ($P=0,02$). Del mismo modo, la proporción de trasplantes bipulmonares realizados fue inferior cuando se emplearon pulmones de DE que cuando se implantaron pulmones de DO. Por el contrario, la causa de la muerte del donante, la indicación del trasplante, la necesidad de circulación extracorpórea, el desarrollo de PGD o la mortalidad a los 30 días no difirió entre ambos grupos de donantes (Tabla 7).

Variables	Donantes extendidos (DE) (n=136)	IC 95%	Donantes óptimos (DO) (n=229)	IC 95%	P
Edad donante (años)	38 ± 16		31 ± 13		<0,001
Causa muerte donante:					0,26
– Traumatismo	43 (32,1%)	24-40	90 (42,5)	36-48	
– Cerebrovascular	66 (49,3%)	41-57	85 (40,1)	34-46	
– Otras	25 (18,7%)	12-24	37 (17,5)	12-22	
Intubación donante (h)	54 ± 54	45-63	37 ± 34	33-41	<0,001
PaO ₂ /FiO ₂ donante (mmHg)	451 ± 88	436-466	489 ± 70	480-498	<0,001
Edad receptor (años)	45 ± 16		40 ± 17		0,02
Indicación trasplante:					0,08
– EPOC	53 (39)	29-49	72 (31,4)	25-37	
– FPI	40 (29,4)	22-36	62 (27,1)	21-33	
– FQ	32 (23,5)	16-30	69 (39,1)	24-36	
– Otras	11 (8)	4-12	26 (11,4)	7-15	
Tipo trasplante:					0,03
– Unipulmonar	70 (41,5)	43-59	81 (35,4)	29-41	
– Bipulmonar	66 (48,5)	40-56	148 (64,6)	58-70	
Necesidad CEC	24 (17,6)	11-23	48 (21)	16-26	0,44
Tpo. isquemia 1° injerto (min)	341 ± 70	329-353	297 ± 43	292-302	<0,001
Tpo. isquemia 2° injerto (min)	496 ± 84	482-510	427 ± 56	420-434	<0,001
PaO ₂ /FiO ₂ receptor (mmHg)	270 ± 141	246-294	309 ± 152	289-329	0,04
PGD 2-3 72 h	14 (14,1)	8-20	19 (12,7)	9-17	0,73
Mortalidad 30 días	27 (19,9)	13-27	45 (19,7)	15-25	0,96

Tabla 7: Comparación entre Donantes Extendidos (DE) y Donantes Óptimos (DO) en la serie. Las variables cuantitativas se muestran como medias ± desviación estándar. Las variables cualitativas se muestran como frecuencias, con los porcentajes entre paréntesis (% dentro de cada grupo). PGD 2-3 a las 72h: Disfunción del injerto grados 2-3 a las 72 horas del trasplante pulmonar.

1.1.2. Receptores extendidos frente a receptores óptimos

El análisis comparativo de los resultados del trasplante pulmonar en función del estado del receptor (RE vs RO) se muestra en la Tabla 8. La distribución por sexos mostró una predominancia hombre a mujer entre los RE. Además, los RE tenían más edad, y recibieron pulmones de donantes más “añosos”. La media del índice de oxigenación fue peor en los RE que en los RO. Como era de esperar, la indicación del trasplante fue significativamente diferente en los RE comparado con los RO. Puesto que la Fibrosis Pulmonar fue un criterio de definición de los RE en la presente serie de pacientes, en los grupos con RE la principal indicación del trasplante fue la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), seguida de la EPOC, la Fibrosis Quística y otras. Por el contrario, en los RO la principal indicación fue la EPOC, seguida de la Fibrosis Quística y de otras. El tipo de trasplante también difirió en función del tipo de receptores, de manera que en los RE se llevaron a cabo más trasplantes unipulmonares respecto a los RO. El índice de oxigenación del receptor a las 24 horas del trasplante fue peor en los RE, que además presentaron una tendencia, aunque no significativa, a una mayor mortalidad a los 30 días (43 fallecimientos, 23,5% vs 29 fallecimientos, 15,9%, respectivamente). La duración de la ventilación mecánica en el donante, la causa de

muerte del donante, el tiempo de isquemia de primero injerto y el desarrollo de PGD no difirió entre los RO y los RE.

Variables	RE (n=183)	IC 95%	RO (n=182)	IC 95%	P
Edad donante (años)	37 ± 14		30 ± 14		<0,001
Causa muerte donante:					0,20
– Traumatismo	63 (34,5%)	27-41	69 (38,3)	36-48	
– Cerebrovascular	88 (49,1%)	42-56	76 (42,3)	34-46	
– Otras	32 (16,4%)	11-21	37 (19,4)	12-22	
Intubación donante (h)	47 ± 48	40-54	40 ± 38	33-41	0,13
PaO ₂ /FiO ₂ donante (mmHg)	464 ± 75	454-474	483 ± 83	480-498	0,03
Edad receptor (años)	47 ± 13		37 ± 17		<0,001
Indicación trasplante					<0,001
– EPOC	41 (22,4)	16-28	84 (46,2)	25-37	
– FPI	102 (55,7)	49-63	0 (0)	21-33	
– FQ	29 (15,8)	17-29	72 (39,6)	24-36	
– Otras	11 (6)	3-9	26 (14,2)	7-15	
Tipo trasplante					<0,001
– Unipulmonar	111 (60,7)	54-68	40 (22)	29-41	
– Bipulmonar	72 (39,3)	32-46	142 (78)	58-70	
Necesidad CEC	43 (23,5)	17-29	29 (15,9)	16-26	0,06
Tpo. isquemia 1° injerto (min)	330 ± 60	311-329	309 ± 56	292-302	0,19
Tpo. isquemia 2° injerto (min)	466 ± 70	456-476	440 ± 73	420-434	0,02
PaO ₂ /FiO ₂ receptor (mmHg)	273 ± 144	252-294	313 ± 150	289-329	0,03
PGD 2-3 72 h	19 (16,7)	12-22	14 (10,4)	9-17	0,14
Mortalidad 30 días	43 (23,5)	17-29	29 (15,9)	15-25	0,06

Tabla 8: Comparación entre Receptores Extendidos (RE) y Receptores Óptimos (RO). Las variables cuantitativas se muestran como medias ± desviación estándar. Las variables cualitativas se expresan como frecuencias, entre paréntesis se muestran las proporciones (% de cada grupo). PGD 2-3 72h= Disfunción del injerto grados 2-3 a las 72 horas del trasplante pulmonar.

1.1.3. Análisis en función de las cuatro posibles combinaciones donante/receptor

En la Tabla 9 se muestra la comparación entre las 4 parejas posibles de donantes/receptores. Globalmente, la distribución por sexos fue similar en las 4 combinaciones. Los donantes tenían más edad en los grupos DO/RE, DE/RO 7 DE/RE comparado con el grupo DO/RO. La duración de la ventilación mecánica en el donante fue también significativamente superior en los grupos DE/RO y DE/RE. Como cabía esperar, la indicación de trasplante fue diferente en los grupos de RE comparado con los del RO. Así, las principales indicaciones de trasplante en ambos grupos de RO fueron la Fibrosis Quística y la EPOC, mientras que en los grupos con RE la indicación más frecuente fue la fibrosis pulmonar. Respecto al tipo de trasplante realizado, el trasplante unipulmonar fue la técnica de elección en los RE. El trasplante pulmonar en un RE tuvo un impacto negativo en la duración de la ventilación mecánica tras el trasplante pulmonar y la estancia en UCI. Hubo una tendencia hacia un incremento en el número de episodios de rechazo agudo entre el 2° y 3° mes tras el trasplante en el grupo DE/RO (media=0,37) y en el de DE/RE (media=0,22) comparado con los grupos

de DO/RO y DO/RE (media= 0,16 y 0,17, respectivamente), $P<0,001$. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto al número de episodios de rechazo agudo ni en el primer mes ni después del tercer mes tras el trasplante. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la causa de muerte del donante, el índice de oxigenación del donante, la edad del receptor, la necesidad de circulación extracorpórea, el índice de oxigenación en el receptor e las primeras 24 horas, la aparición de disfunción primaria del injerto o a mortalidad a los 30 días entre todas las combinaciones posibles de donantes y receptores.

Variables	Grupo 1 n=122 (33)	IC 95%	Grupo 2 n=106 (29)	IC 95%	Grupo 3 n=61 (21)	IC 95%	Grupo 4 n=76 (21)	P
Edad donante (años)	27 ± 12		35 ± 12		37 ± 17		40 ± 15	<0,001
Muerte donante								
-Trauma	51 (44,8)	36-54	38 (40)	31-49	22 (36,7)	25-49	21 (28)	0,44
-Cerebrovasc.	43 (37,1)	29-45	41 (43,2)	34-52	25 (41,7)	30-54	42 (56,0)	
-Otras	21 (18,1)	11-25	16 (16,8)	10-24	13 (21,7)	12-32	12 (16,0)	
IOT donante (h)	36 ± 33	30-42	38 ± 35	31-45	47 ± 47	36-58	49 ± 59	<0,001
PaO ₂ /FiO ₂ donante (mmHg)	497 ± 73	484-510	480 ± 16	467-493	458 ± 93	435-481	445 ± 82	0,08
Edad receptor (años)	35 ± 17		46 ± 17		41 ± 16		48 ± 16	0,17
Indicación:								
-EPOC	51 (41,8)	33-51	21 (19,8)	13-27	33 (54,1)	42-66	20 (17,1)	<0,001
-FPI	0 (0)		61 (57,5)	48-66	1 (1,6)	0-5	40 (52,6)	
-FQ	53 (43,4)	34-52	16 (15,1)	8-22	19 (31,1)	20-42	13 (17,1)	
-Otras	18 (14,7)	9-21	8 (7,5)	2-12	8 (10,1)	3-17	3 (3,9)	
Tipo trasplante:								
-Unipulmonar	18 (14,8)	9-21	62 (58,5)	49-67	23 (37,7)	26-50	48 (63,2)	<0,001
-Bipulmonar	104 (85,2)	79-91	44 (41,5)	32-50	38 (62,3)	50-74	28 (36,8)	
Necesidad CEC	18 (14,8)	9-21	30 (28,3)	20-36	11 (18,3)	9-27	13 (17,1)	0,06
Tpo. isquemia 1º injerto (min)	295 ± 42	288-302	300 ± 43	292-308	335 ± 70	318-352	345 ± 69	<0,001
Tpo. isquemia 2º injerto (min)	422 ± 58	412-432	442 ± 49	432-452	492 ± 87	471-513	501 ± 81	0,001
PaO ₂ /FiO ₂ receptor (mmHg)	311 ± 151	284-338	308 ± 154	278-338	316 ± 149	280-352	231 ± 120	0,17
IOT receptor	69 ± 145	43-95	107 ± 291	50-164	39 ± 40	29-49	104 ± 204	0,01
Estancia UCI (d)	11 ± 10	9-13	15 ± 18	12-18	12 ± 12	9-15	13 ± 16	0,03
PGD 2-3 72 h	12 (13,5)	7-19	7 (11,7)	6-18	2 (4,3)	0-9	12 (22,6)	0,05
Mortalidad 30 (d)	17 (13,9)	8-20	28 (26,4)	18-34	12 (19,7)	10-30	15 (19,7)	0,13

Tabla 9: Comparación entre las 4 posibles combinaciones de donante/receptor en la serie. Grupo 1=DO/RO; Grupo 2=DO/RE; Grupo 3=DE/RO; Grupo 4=DE/RE. Las variables cuantitativas se muestran como medias ± desviación estándar. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias, con los porcentajes entre paréntesis (% dentro de cada grupo). VM=Ventilación mecánica. PGD 2-3 72h= Disfunción del injerto grados 2-3 a las 72 horas del trasplante pulmonar.

1.1.4. Síndrome de Bronquiolitis Obliterante (BOS)

El análisis del BOS incluyó solo a aquellos receptores que sobrevivieron más allá del primer año tras el trasplante. Hubo una tendencia no significativa hacia una aparición más tardía del BOS en los receptores de DO (mediana 9 años, IC 95% 7,5-10,6) comparado con los receptores de DE (mediana 6,4, IC 95% 4,2-8,6) ($P=0,61$) (Figura 8A). Por el contrario, la aparición del BOS fue similar entre RE y RO (8 años, IC 95% 5,8-10,1 vs 8,5 años, IC 95% 6,0-11,1)($P=0,35$)(Figura 8B). Cuando se compararon los 4 grupos de estudio, persistieron las diferencias sutiles en la aparición

del BOS en los grupos de DO: DO/RO 8,0 años, IC 95% 5,9-10,1; DO/RE 9,2 años, IC 95% 6,9-11,3; DE/RO 6,7 años, IC 95% 4,1-9,4; y DE/RE 6,4 años, IC 95% 3,2-9,6 (P=0,54) (Figura 8C).

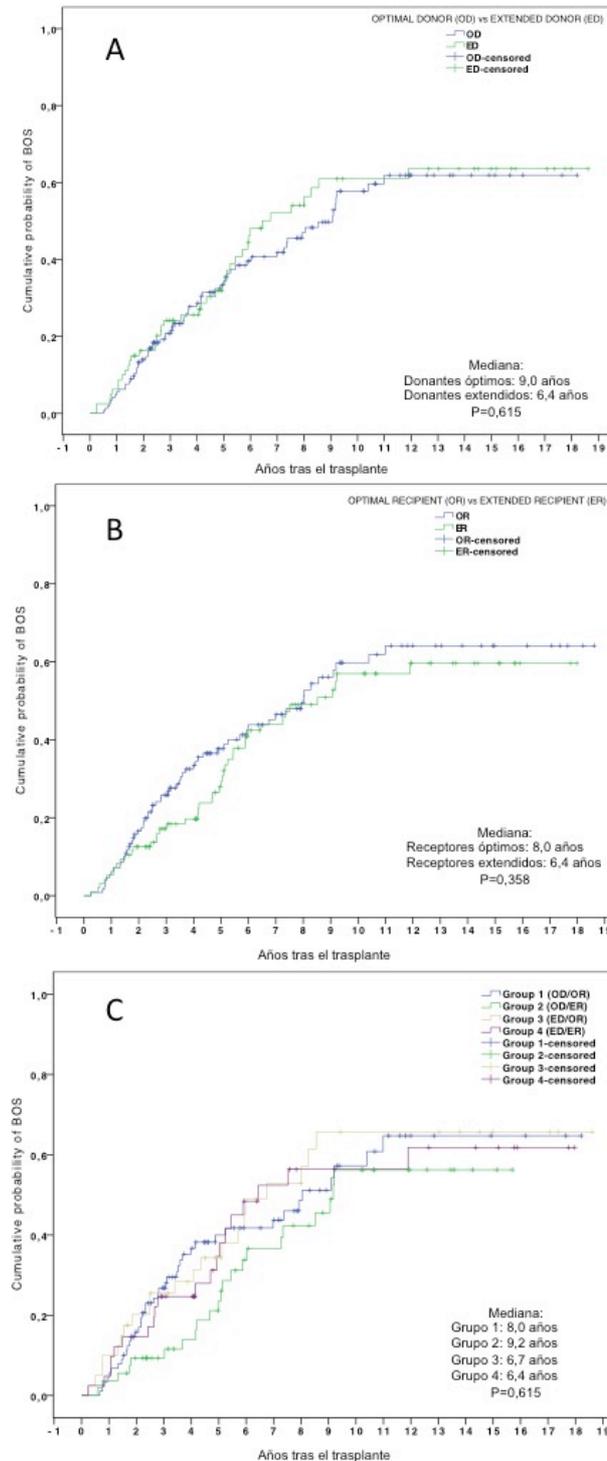


Figura 8: Probabilidad acumulada de BOS. A) Comparación de la probabilidad acumulada de BOS entre receptores que recibieron pulmones de donantes óptimos (DO) y aquellos que recibieron pulmones de donantes con criterios extendidos (DE). B) Comparación de la probabilidad acumulada de BOS entre los receptores óptimos (RO) y los receptores extendidos (RE). C) Comparación de la probabilidad acumulada de BOS entre los 4 grupos de combinaciones posibles donante/receptor de la serie.

1.1.5. Supervivencia

La supervivencia actuarial de los receptores de trasplante pulmonar en función del estado del donante y del receptor (óptimo vs extendido) se muestra en la Figura 10. Un hallazgo interesante fue que no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes que recibieron pulmones de donantes óptimos (DO, mediana supervivencia 4,1 años, IC 95% 2,5-5,6) y aquellos que recibieron pulmones de donantes extendidos (DE, mediana supervivencia 6,6 años IC 95% 1,7-11,6)(Figura 9-A). Por el contrario, los RE sobrevivieron menos que los RO (mediana supervivencia 2,7 años, IC 95% 1,2-4,1 vs 8,5 años, IC 95% 4,7-12,2) (P=0,002)(Figura 9-B). Además, cuando se compararon los 4 grupos del estudio, los RE sobrevivieron menos que los RO, independientemente de la calidad de los donantes: DO/RE 2,1 años (IC 95% 0-4,4) y DE/RE 3,6 años (IC 95% 0,3-6,9) vs DO/RO 7,0 años (IC 95% 2,8-11,2) y DE/RO 9,4 años (IC 95% 3,1-15,7)(P=0,004)(Figura 9-C).

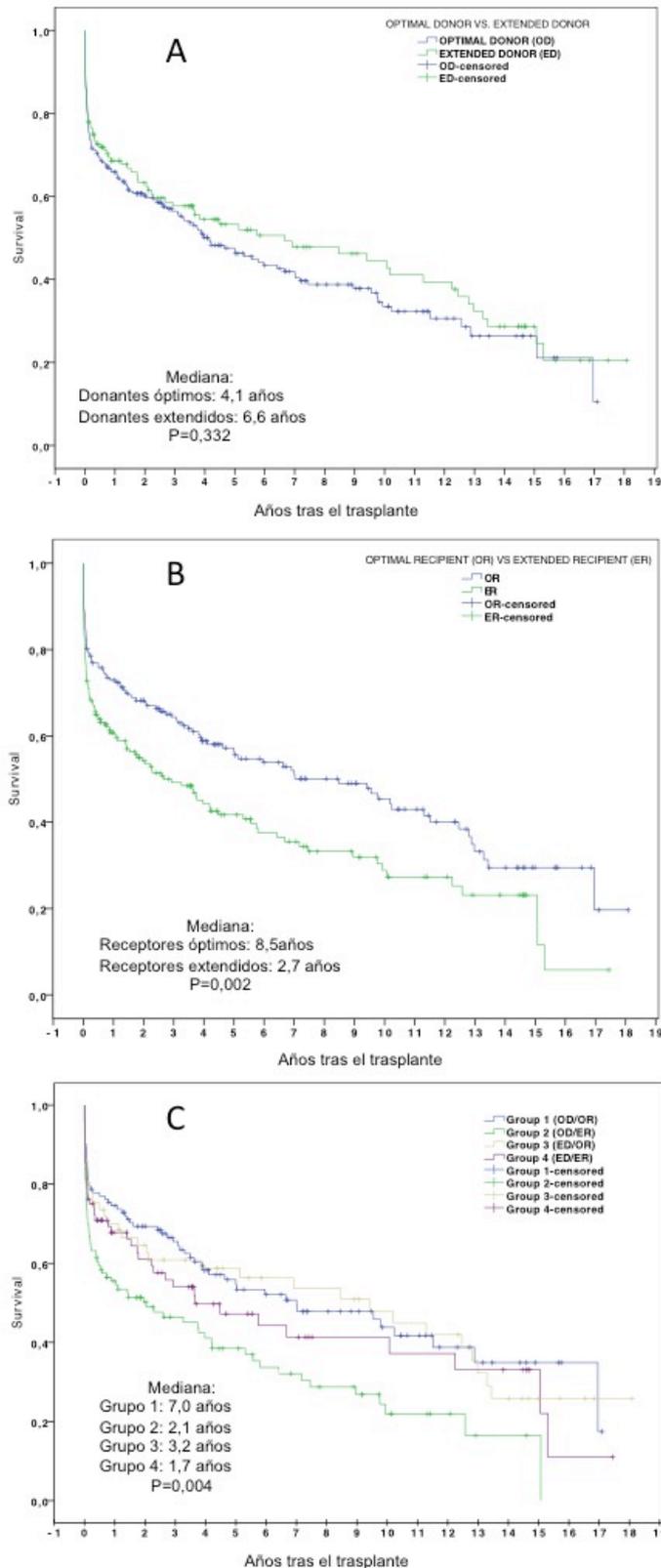


Figura 9: Supervivencia tras el trasplante pulmonar. A) Comparación entre la supervivencia de los pacientes que recibieron donantes óptimos (DO) y los que recibieron donantes extendidos (DE). B) Comparación entre la supervivencia de los receptores óptimos (RO) y la de los receptores extendidos (RE). Supervivencia en los 4 grupos posibles de emparejamiento donante/receptor.

1.2. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia

En la siguiente Figura 10 se representan de forma gráfica los tiempos más relevantes en el proceso de donación y trasplante pulmonar. Se analizaron los resultados del trasplante pulmonar, tomando como base 2 tiempos objetivos: intubación del donante y extracción pulmonar. En función de esto, se dividió la población de estudio en 2 grupos, en función de que la extracción pulmonar se realizara precozmente (<24h) o de forma tardía (>24h).

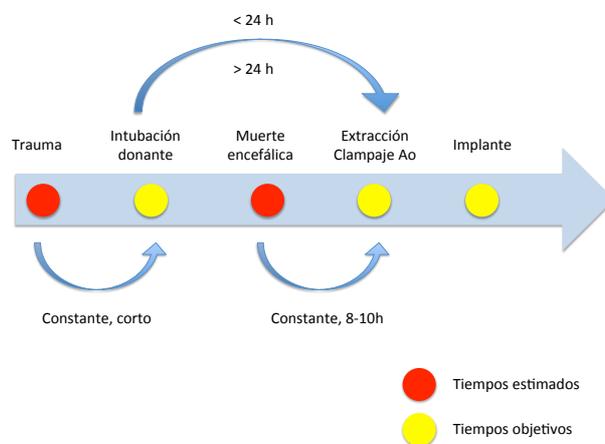


Figura 10: Representación gráfica de los tiempos más relevantes en el proceso de donación y trasplante pulmonar.

Se analizaron 132 trasplantes de donantes fallecidos por causa traumática. Las principales indicaciones se muestran en la Figura 11. Por orden de frecuencia, la indicación de trasplante más frecuente fue la EPOC (41 casos, 31%), seguida de la Fibrosis Quística (38 casos, 29%), la Fibrosis Pulmonar Idiopática (31 casos, 23%), las bronquiectasias (9 casos, 7%) y otras en 13 pacientes (10%). Los donantes fueron hombres en un 76% (n=100) y mujeres en el 24% (n=32) con una media de edad de 24 ± 11 (7–61) años.

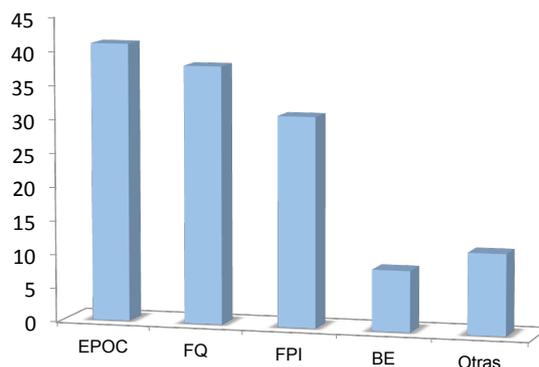


Figura 11: Indicaciones de Trasplante Pulmonar en la serie de pacientes. EPOC= Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; FQ= Fibrosis Quística; FPI= Fibrosis Pulmonar Idiopática. BE= Bronquiectasias no-Fibrosis Quística.

La comparación entre los Grupos A y B se muestra en la Tabla 10. Hubo 73 pacientes en el Grupo A (55%) y 59 en el B (45%). Hubo una ligera predominancia de hombres a mujeres entre los donantes traumáticos en ambos grupos A y B, aunque no significativa ($P=0,466$). Cabe destacar que los donantes del Grupo B eran más jóvenes ($22,1 \pm 12,1$ años) que los del A ($26,2 \pm 12,1$ años, $P=0,027$), y lógicamente estuvieron intubados por periodos más prolongados (67.1 ± 44.7 vs 20.4 ± 4.6 , $P<0.001$). Además, los receptores del Grupo B desarrollaron más episodios de rechazo agudo en el primer mes que los del Grupo A (0.83 ± 0.7 vs 0.48 ± 0.5 , $P=0.007$). Otros factores tales como la oxigenación del donante, los tiempos de isquemia, la oxigenación del receptor al llegar a la UCI y la duración de la ventilación mecánica en el receptor no difirieron de forma significativa entre los grupos. Del mismo modo, no hubo diferencias respecto al uso de donantes extendidos, el diagnóstico del receptor, el tipo de trasplante realizado o la necesidad de circulación extracorpórea (Tabla 10).

Variabes	Grupo A (n=73)	IC 95%	Grupo B (n=59)	IC 95%	p
Edad donante (años)	26.2±12.1	23.5-28.9	22.1±9.1	19.8-24.4	0.027
<i>Sexo donante:</i>					
- Hombre	56 (77)	45-67	44 (75)	33-55	0.466
- Mujer	17 (23)	8-26	15 (25)	4-26	
Edad receptor (años)	40.9±17.5	36.9-44.9	40.1±18.0	35.5-44.7	0.808
<i>Sexo receptor:</i>					
- Hombre	56 (77)	45-67	37 (67)	25-49	0.088
- Mujer	17 (23)	8-26	22 (33)	10-34	
IOT donante (h)	20.4±4.6	19.4-21.4	67.1±44.7	55.7-78.5	0.000
PaO ₂ /FiO ₂ donante(mmHg)	479±79	461-497	475±83	454-496	0.773
Donante extendido	10 (13)	3-17	12 (20)	2-22	0.233
<i>Indicación trasplante:</i>					
Enfisema	22 (30)	12-32	19 (32)	7-31	0.477
Fibrosis pulmonar	17 (23)	8-26	14 (24)	3-25	
Fibrosis Quística	24 (31)	14-34	14 (24)	3-25	
Bronquiectasias	4 (5)	0-8	5 (8)	0-10	
Otras	6 (11)	0-12	7 (12)	0-14	
<i>Tipo de trasplante:</i>					
Unipulmonar	30 (41)	19-41	23 (39)	11-35	0.302
Bipulmonar	42 (57)	31-53	35 (59)	23-47	
Combinado	1 (2)		1 (2)		
Necesidad CEC	11 (15)	3-19	7 (12)	0-14	0.393
Tpo. isquemia (1° injerto (min))	322±73	305-338	331±78	311-351	0.437
Tpo. isquemia (2° injerto (min))	453±80	435-471	467±62	451-483	0.424
PaO ₂ /FiO ₂ 24 h receptor (mmHg)	303±143	270-336	208±133	174-242	0.573
IOT receptor (h)	99±217	49-149	100±213	46-154	0.993
Estancia UCI receptor (días)	32±20	28-36	32±18	28-36	0.136
<i>Rechazo Agudo (n):</i>					
- Global	0.93±1.0	0.58-1.28	1.49±1.2	1.19-1.79	0.012
- 1° mes	0.48±0.5	0.37-0.59	0.83±0.7	0.66-1.0	0.007
- 2°-3° meses	0.23±0.42	0.14-0.32	0.40±0.5	0.38-0.52	0.111
- >3° mes	0.30±0.5	0.19-0.41	0.34±0.6	0.19-0.49	0.715
Disfunción primaria injerto	9 (16)	1-17	13 (26)	2-24	0.178
Complicaciones bronquiales	12 (17)	4-20	4 (7)	0-8	0.110
Mortalidad 30 días	7 (10)		2 (3.5)		0.130
Mortalidad global	40 (51)	29-51	38 (49)	25-51	0.290
<i>Causa muerte:</i>					
- Infección (no-CMV)	13 (33)		15 (41)		0.634
- BOS	9 (23)		12 (33)		0.446
- PGD	5 (12)		5 (8)		0.430
- Fallo cardiaco	5 (12)		2 (6)		0.430
- Quirúrgica	5 (12)		1 (3)		0.130
- CMV	2 (5)		1 (3)		0.510
- Rechazo Agudo	1 (3)		2 (6)		0.615

Tabla 10: Comparación entre los grupos A y B. Las variables cuantitativas se expresan como medias ± desviación estándar. Las variables cualitativas se expresan como valores absolutos, con los porcentajes entre paréntesis. CMV=citomegalovirus; BOS= síndrome de bronquiolitis obliterante; PGD= Disfunción primaria del injerto.

1.2.1. Mortalidad

La mortalidad global fue similar en ambos grupos: 50 pacientes (55%) fallecieron en el Grupo A, comparado con 38 pacientes (64%) en el Grupo B ($P=0,29$). La infección por gérmenes distintos al citomegalovirus (CMV) junto con el BOS causaron 2/3 de los fallecimientos en la serie (28 y 21 casos, respectivamente). Otras causas de muerte menos frecuentes fueron el PGD (7 pacientes, 10%), el fallo cardíaco (7 pacientes, 10%), complicaciones quirúrgicas (5 pacientes, 7%), infección por CMV (3 pacientes, 4%), o el rechazo agudo (3 pacientes, 4%). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Algunos pacientes desarrollaron más de una complicación. Al analizar la mortalidad a los 30 días, sólo 2 pacientes (3%) del Grupo B fallecieron dentro del primer mes del trasplante, comparado con 7 pacientes (10%) del Grupo A, pero estas diferencias tampoco fueron significativas (Tabla 10).

1.2.2. Disfunción primaria del injerto

La incidencia global de PGD grados 2-3 a las 72 horas del trasplante fue del 17% (IC 95% 10-23%) (22 receptores). No hubo diferencias en la aparición de PGD entre los Grupos A y B, aunque hasta un 26% de pacientes ($n=13$) del Grupo B desarrollaron PGD comparado con 9 pacientes (16%) del Grupo A ($P=0,17$) (Tabla 10).

1.2.3. Supervivencia

En la Figura 12 se muestran las curvas de supervivencia para ambos grupos. La supervivencia global del Grupo A fue de 5,7 años, comparada con 5 años en el Grupo B, sin existir diferencias estadísticamente significativas ($P=0,93$)(Figura 12-A). Cuando se analizaron sólo aquellos pacientes que sobrevivieron al menos el primer año tras el trasplante pulmonar, la probabilidad de supervivencia fue también similar en ambos grupos, de modo que la supervivencia del Grupo A fue de 11,5 años y del Grupo B 12,8 años ($P=0,99$)(Figura 12-B). A continuación, se llevó a cabo un análisis de la supervivencia estratificando por la indicación de trasplante. Se observó que la supervivencia fue similar en los Grupos A y B para los pacientes trasplantados por EPOC y Fibrosis Quística ($P=0,51$ y $P=0,96$, respectivamente). Por el contrario, los pacientes trasplantados por Fibrosis Pulmonar presentaron peor supervivencia cuando recibieron pulmones procedentes de donantes traumáticos, extraídos en las primeras 24 horas tras la muerte encefálica (Grupo A, Figura 13). El hecho de que las

diferencias encontradas no alcanzasen significación estadística probablemente se deba a que no hubo supervivientes a largo plazo en el Grupo B.

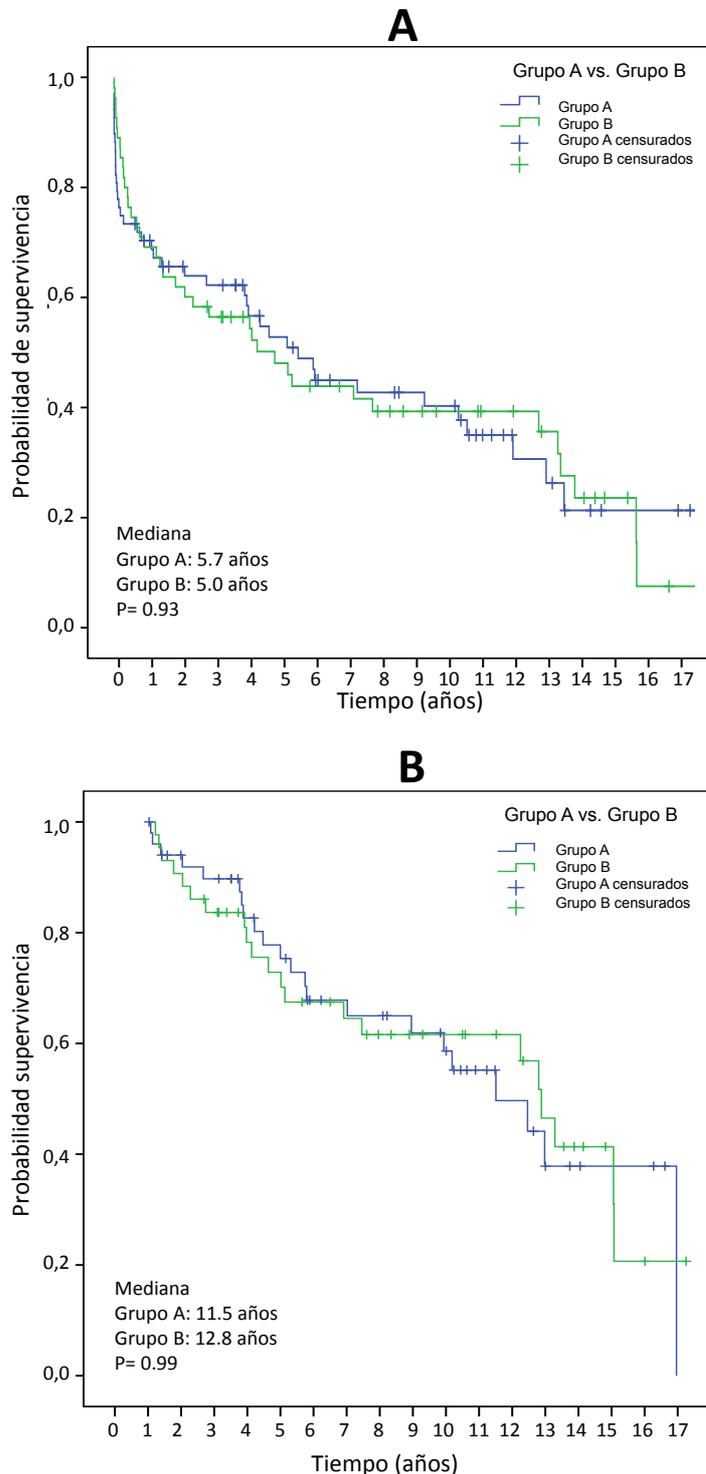


Figura 12: Probabilidad de supervivencia tras el trasplante pulmonar. A) Probabilidad de supervivencia comparando los receptores de pulmones procedentes de donantes traumáticos extraídos en las primeras 24 horas tras la muerte encefálica (Grupo A), con los receptores de pulmones procedentes de donantes traumáticos y extraídos más allá de las primeras 24 horas tras la muerte. B) Probabilidad de supervivencia condicional a aquellos receptores que sobrevivieron el primer año tras el trasplante pulmonar, comparando a los receptores de donantes traumáticos extraídos en las primeras 24 horas (Grupo A) con aquellos en los que la extracción se realizó más allá de las primeras 24 horas (Grupo B). Métodos de Kaplan-Meier y log-rank.

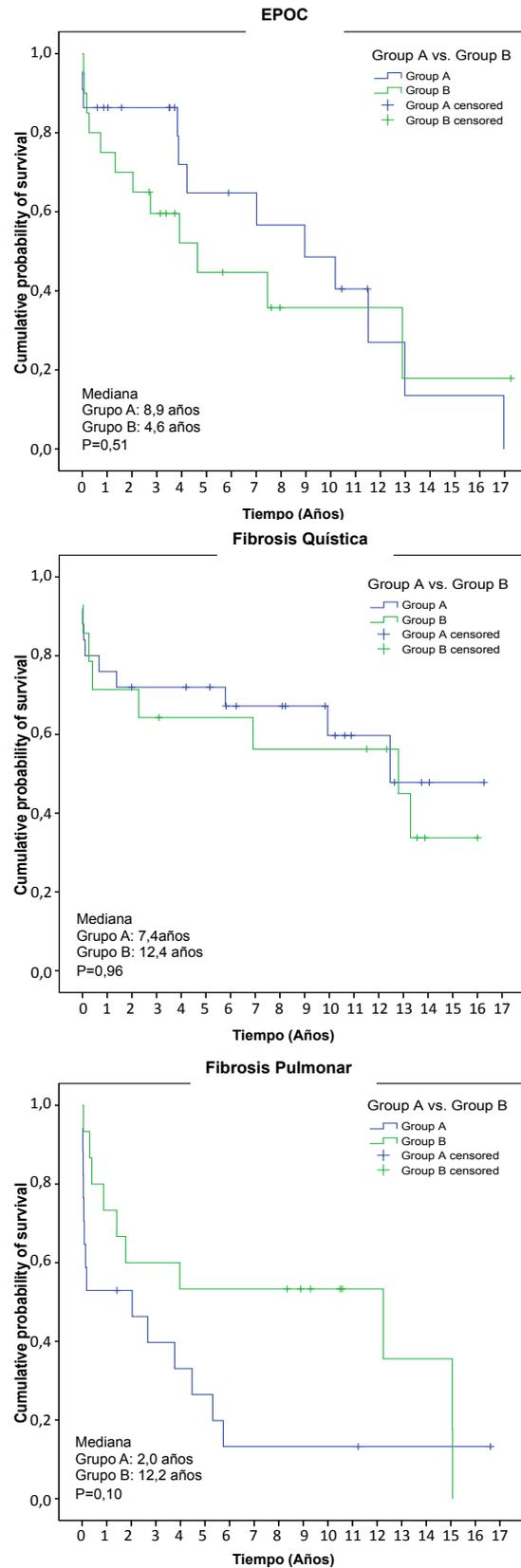


Figura 13: Probabilidad de supervivencia en función de la indicación de trasplante pulmonar. Probabilidad de supervivencia comparando los Grupos A y B, estratificando en función de la indicación del trasplante: A) EPOC; B) Fibrosis Quística; C) Fibrosis Pulmonar. Métodos de Kaplan-Meier y log-rank.

1.2.4. Síndrome de Bronquiolitis Obliterante (BOS)

La probabilidad de supervivencia libre de BOS fue del 82%, 72%, 37% y 22% para el Grupo A y del 78%, 68%, 42% y 15% para el Grupo B, a los 3, 5, 10 y 15 años, respectivamente. No hubo diferencias ni en la serie global (Figura 14-A, $P=0,88$), ni al analizar sólo aquellos pacientes que sobrevivieron más allá del primer año tras el trasplante pulmonar (Figura 14-B, $P=0,91$).

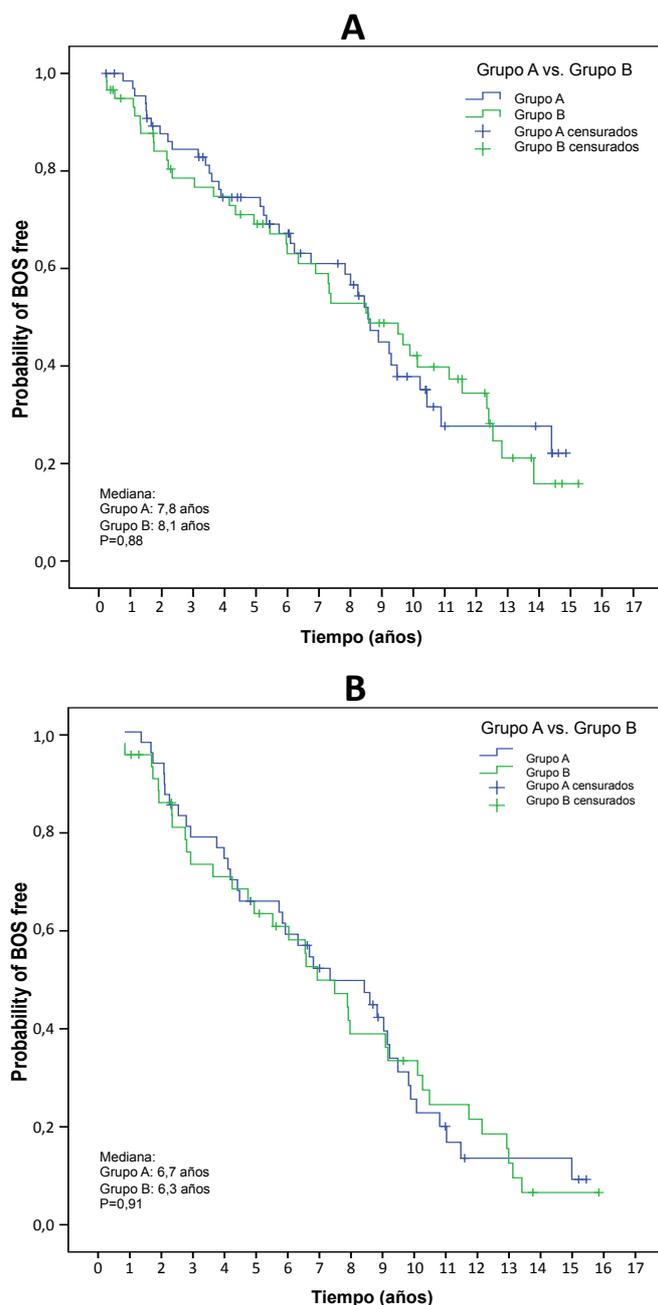


Figura 14: A) Probabilidad de supervivencia libre de bronquiolitis obliterante (BOS) en los Grupos A y B. B) Probabilidad de supervivencia libre de BOS condicional a aquellos que sobrevivieron el primer año tras el trasplante pulmonar, en los receptores de los Grupos A y B. Grupo A= pulmones extraídos en las primeras 24 horas de donantes fallecidos por causa traumática; Grupo B= pulmones extraídos más allá de las primeras 24 horas de donantes fallecidos por causa traumática. Método de Kaplan-Meier y test de log-rank.

2. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOGENESIS PULMONAR. ANÁLISIS METABOLÓMICO Y RUTA DE SEÑALIZACIÓN DYRK2-SIAH2.

2.1. Caracterización de la población de estudio

De los 76 pacientes incluidos en este estudio, el 88,16% (n=67) fueron hombres y el 11,84% (9 casos) mujeres. La edad media de los sujetos del estudio fue de 65,6 años, con un intervalo que osciló entre los 36 y los 81 años, siendo la desviación típica de 9,17. El 36,7% (29 pacientes) cumplían los criterios de diagnóstico de EPOC en el momento de la recogida de los datos. El 95% de los pacientes de la muestra (72 casos) presentaban un antecedente de tabaquismo, siendo la media de consumo de tabaco de 50,2 paquetes/año (Tabla 11).

Variables	Adenocarcinoma (n=36)	Epidermoide (n=40)	P
Edad (Media)	62.22±9.83	68.79±7.46	0.002
Género			0.001
Hombre	27	40	
Mujer	9	0	
Comorbilidades	28	37	0.02
Neoplasias	9	2	0.02
Metástasis en el seguimiento	7	0	0.005
Tamaño tumor	3.62±1.96	4.6±2.06	0.04
SUVmáx tumor	11.55±8.16	13.4±5.73	0.35
pTNM			0.479
IA	11	6	
IB	8	13	
IIA	7	8	
IIB	4	7	
IIIA	5	6	
IIIB	1	0	
Grado diferenciación			0.112
I	4	2	
II	16	18	
III	11	18	
N.E.	5	2	

Tabla 11. Características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes del estudio. SUVmáx: maximum Standard Uptake Value (PET/TC); pTNM: TNM patológico. N.E.= No evaluado.

Un 84,5% de pacientes (65 casos) presentaban comorbilidades, destacando por orden de frecuencia las enfermedades cardiovasculares (45,6%, 35 casos), respiratorias (36,7%, 28 casos), digestivas (22,8%, 17 casos), diabetes mellitus (16,5%, 12 casos), neurológicas (12,7%, 9 casos), urológicas (8,9%, 6 casos), y hepáticas (3,8%, 3 casos). El 10% de la población de estudio (8 casos) presentaba un antecedente de alcoholismo en grado moderado. Cabe destacar el antecedente de enfermedad neoplásica en el 15,2% de los individuos del estudio (12 pacientes). En la Figura 16 se representan los diferentes tipos de neoplasias previas que presentaron los pacientes de la serie de estudio. Cabe destacar que el antecedente neoplásico de

laringe fue el más prevalente en la serie, y que varios pacientes habían superado más de un tipo de neoplasia en el pasado.

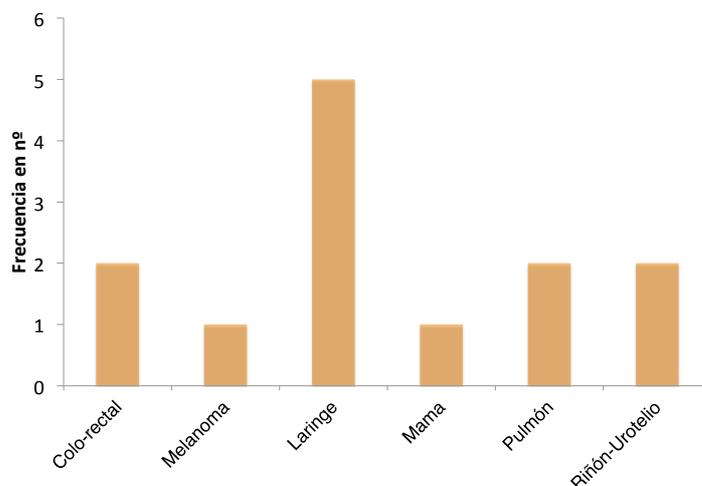


Figura 16: Antecedente de neoplasia en la serie de pacientes.

Respecto a la anamnesis, un 12% de pacientes (10 casos) refirieron una pérdida de peso significativa en el momento de la consulta. Ningún paciente presentó síntomas constitucionales ni síndromes paraneoplásicos al diagnóstico. La forma de presentación fue incidental en el 49,4% de los casos (39 pacientes) y sintomática en el resto. Entre los síntomas más frecuentes destacó la hemoptisis (11,4%, 9 casos), la neumonía (11,4%, 9 casos), el dolor torácico (11,4%, 9 casos) y la tos (10,1%, 8 casos).

En la Figura 17 se muestra la frecuencia de localización de los tumores. La localización más frecuente fue el lóbulo superior derecho (36,7%, 28 casos), seguida del lóbulo superior izquierdo (27,8%, 23 casos) y del lóbulo inferior derecho (20,3%, 16 casos). En ningún caso se seleccionó para la intervención quirúrgica a pacientes con un estadio cIIIA por afectación ganglionar mediastínica (N2) que hubieran recibido quimioterapia de inducción, como tampoco a pacientes con estadios IIIB o IV. El 56% de los pacientes intervenidos presentaron un estadio clínico I (IA+IB).

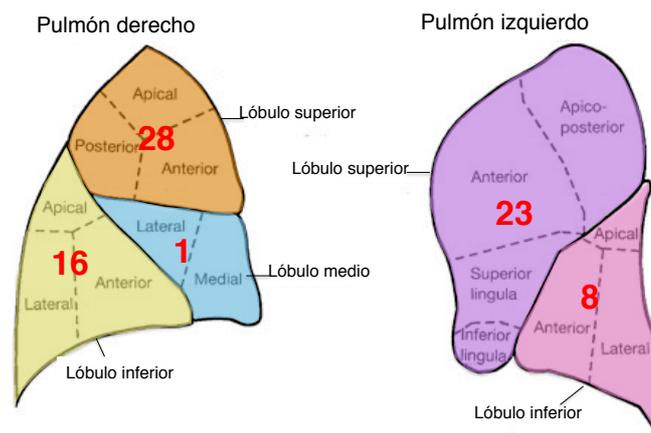


Figura 17: Localización por lóbulos de los tumores resecados en la cohorte de pacientes analizada en el estudio.

El relación al estadiaje TNM patológico (pTNM), el 52% de los pacientes se confirmó un tumor en estadio I (IA+IB), existiendo un incremento de pacientes con estadio IIA respecto al TNM clínico (18% vs 13%), así como del estadio IIIA (16% vs 13%). En cuanto a la estadificación patológica en función del predictor N (afectación ganglionar loco-regional), el 70,1% de los casos el tumor no se había extendido a los ganglios linfáticos regionales (pN0, 53 pacientes). Se determinó una afectación de los ganglios mediastínicos hiliares en el 15,2% de los casos (pN1, 11 pacientes), y mediastínicos en el 12,7% (pN2, 9 pacientes). En 3 pacientes no se pudo determinar la afectación ganglionar por no haberse realizado una linfadenectomía durante la intervención quirúrgica (pNx, 1,3%). A lo largo del seguimiento, 6 pacientes desarrollaron metástasis a distancia (pM1b, 8,9%). Respecto al grado de diferenciación tumoral de las muestras incluidas en el estudio, el 44,3% de los tumores (n=33) extirpados eran moderadamente diferenciados, el 38% pobremente diferenciados (n=28), y sólo el 7,6% (n=5) eran tumores bien diferenciados. El patólogo no determinó el grado de diferenciación tumoral en el 10,1% de los tumores (n=7).

El tamaño medio de los tumores extirpados fue de 4,02 centímetros, con un rango entre 0,5 cms. y 11,0 cms. y una desviación típica de 2,09. Atendiendo al tipo de cirugía realizado en los pacientes, se logró una extirpación completa del tumor (R0) en el 96,2% de los pacientes (73 casos); sin embargo, se detectó una afectación microscópica del margen de resección (R1) en 3 pacientes (3,8%). La mayoría de los pacientes no precisó tratamiento adyuvante tras la cirugía (46,8%, 35 casos). No obstante, se administró quimioterapia adyuvante en el 29,1% (22 pacientes), radioterapia adyuvante en el 2,5% (2 casos), y quimioterapia + radioterapia

adyuvantes en el 5,1% (4 pacientes). En 13 pacientes (16,5%) no se pudo analizar si recibieron o no tratamiento sistémico complementario tras la intervención quirúrgica.

A lo largo del seguimiento, fallecieron como causa del cáncer el 15,2% de los pacientes (n=12). El 79,8% (60 pacientes) permanecieron vivos y libres de enfermedad, mientras que un 3,8% (3 pacientes) estaban vivos con enfermedad neoplásica en tratamiento. No se pudo determinar la situación acerca del estado de salud (vivo o muerto) en 1 paciente (1,3%).

2.2. Estudio de la expresión de SIAH2 a nivel de ARNm en el cáncer de pulmón

Con el objeto de determinar la expresión de SIAH2 en el cáncer de pulmón, se comenzó por investigar la expresión de SIAH2 a nivel de ARNm por PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de tejido pulmonar tanto tumoral como en su correspondiente tejido sano adyacente. Se examinaron 76 piezas quirúrgicas de resección pulmonar por carcinoma broncogénico, comprendiendo tanto el tumor como su correspondiente tejido sano adyacente. Por consiguiente, se analizaron un total de 152 muestras. De las 76 piezas quirúrgicas, 36 correspondieron a adenocarcinomas y 40, a carcinomas epidermoides.

Se determinó la calidad de las muestras analizadas empleando el sistema de microchips Experion™ RNA StdSens Analysis, mediante el indicador RQI (RNA quality indicator). Los cambios en la expresión de SIAH2 en las muestras tumorales comparadas con las correspondientes sanas se expresaron como veces de inducción. Como se muestra en la Figura 18, se evidenciaron cambios sutiles en la expresión de SIAH2 tanto en el adenocarcinoma como en el carcinoma epidermoide de pulmón, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

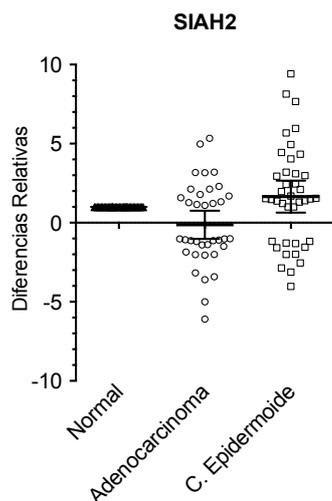


Figura 18: Expresión de SIAH2 a nivel de ARN mensajero en las muestras de CBCNP. Se extrajo ARN total a partir de muestras de cáncer de pulmón preservadas en RNALater. A continuación, se determinó la integridad del mismo, incluyéndose en el análisis aquellas muestras cuyo valor del RIN fue superior a 9. Se compararon los cambios en la expresión de SIAH2 en las muestras tumorales con el tejido sano correspondiente a cada muestra, mediante qPCR, expresándose los cambios como veces de inducción. Los valores se normalizaron frente a β -actina y HPRT, calculándose las veces de inducción génica empleando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se presentan como el valor medio \pm DE.

2.3. Estudio de la expresión de SIAH2 a nivel proteico en el cáncer de pulmón

A continuación, se investigó si existían diferencias en la expresión de SIAH2 a nivel proteico en el cáncer de pulmón, comparado con el tejido pulmonar sano. Para ello, se llevó a cabo una extracción de proteínas de tejido de los mismos 76 casos empleados en el análisis del ARNm, y se comparó la expresión de SIAH2 en las muestras tumorales con la expresión en el tejido sano correspondiente, mediante Western blot. Se analizaron y cuantificaron las bandas de todos los geles por densitometría. Así, se comparó la expresión de SIAH2 a nivel proteico en los tumores con la expresión en el tejido sano, después de normalizar con las intensidades de β -actina. Los resultados se expresan como densidades relativas. En la Figura 19 se muestra un gel representativo.

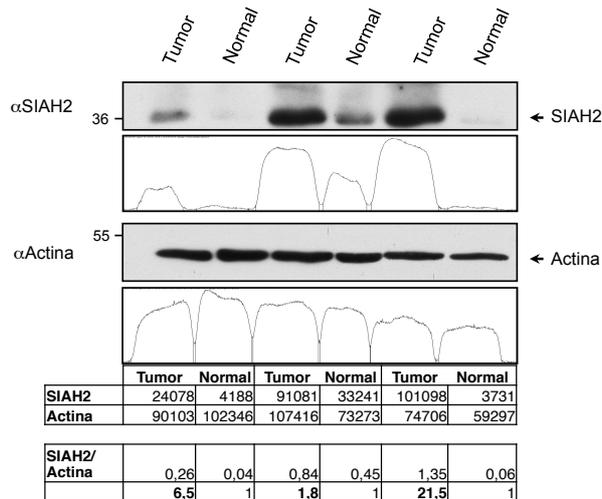


Figura 19: Gel representativo de la expresión de SIAH2 a nivel de proteína en muestras de cáncer de pulmón comparado con el tejido sano correspondiente, después de normalizar frente a actina. Los valores que se muestran bajo los geles indican las señales de intensidad de SIAH2 y actina, cuantificadas empleando el software ImageJ. Se calculó la expresión relativa de SIAH2 por densitometría óptica, y se compararon los valores en las muestras tumorales con los del tejido sano, tras normalizar frente a actina.

Se observó que la expresión de SIAH2 a nivel proteico estaba incrementada significativamente en las muestras tumorales, tanto de adenocarcinoma como de carcinoma broncogénico, comparado con el tejido pulmonar sano (Figura 20). Además, el mayor incremento en la expresión de SIAH2 se produjo en el adenocarcinoma, en el que la expresión se vio incrementada por 4 comparado con el carcinoma epidermoide, en el que la expresión fue del doble.

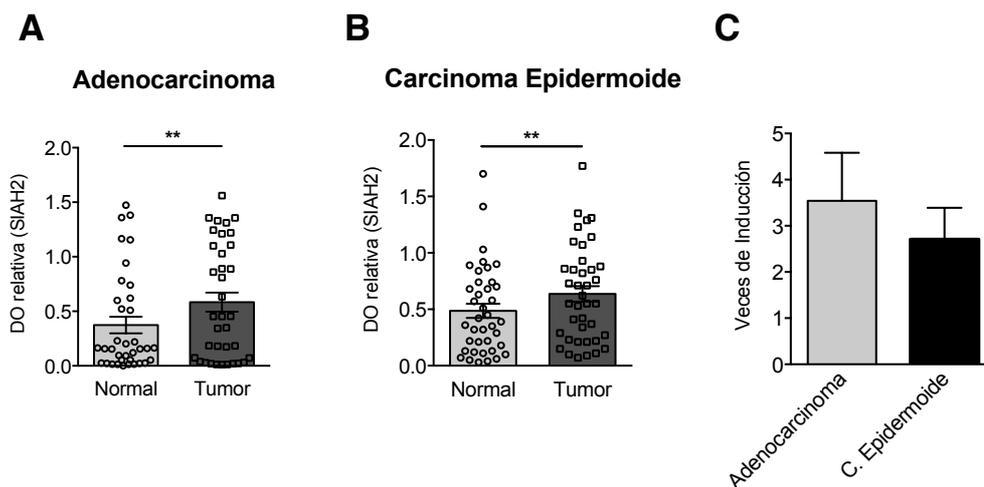


Figura 20: Expresión de SIAH2 a nivel de proteína en muestras de cáncer de pulmón de pacientes, comparado con el correspondiente tejido sano adyacente. (A, B): Se extrajeron proteínas de muestras de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, así como del correspondiente tejido sano para cada una de las muestras, llevándose a cabo un análisis de la expresión proteica por Western-blot y una cuantificación de las bandas por densitometría, tras normalizar frente a actina. Los resultados se expresan como valores relativos de densitometría óptica, y se representan como medias \pm DE. (C) Se representan los cambios en la inducción de SIAH2 en las muestras tumorales comparadas con las sanas del mismo paciente, representándose los resultados como medias \pm DE.

2.4. Estudio de la expresión de SIAH2 en función del grado de diferenciación tumoral en el cáncer de pulmón

Para estudiar si la expresión de SIAH2 puede correlacionarse con la carcinogénesis pulmonar, decidimos evaluar la expresión de SIAH2 y su patrón de localización celular en el cáncer de pulmón por inmunohistoquímica. La intensidad de señal de SIAH2 fue muy elevada en ambos tipos histológicos de cáncer de pulmón, siendo la localización de la tinción predominantemente nuclear (Figura 21). Así, la intensidad de señal fue moderada a fuerte en las muestras tumorales comparado con el tejido sano, el cual presentaba una tinción ocasional y aislada.

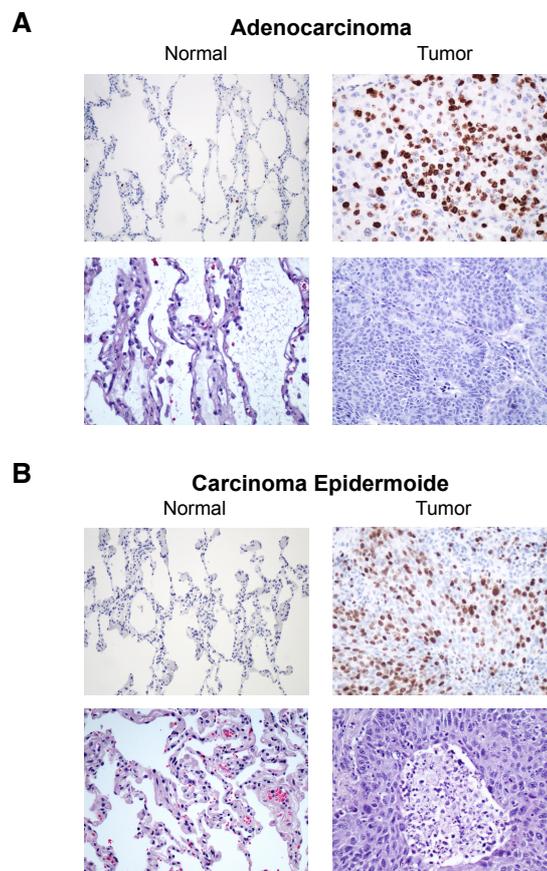


Figura 21: Expresión de SIAH2 en muestras de adenocarcinoma (A) y carcinoma epidermoide (B), mediante técnicas de inmunohistoquímica. Se muestran imágenes representativas de cáncer de pulmón y su tejido sano correspondiente, empleando el anticuerpo anti-SIAH2 y hematoxilina-eosina (HE) (x100).

A continuación, se decidió investigar si la expresión endógena de SIAH2 a nivel proteico se modifica con el grado de agresividad del tumor. Para ello, se analizó la expresión de SIAH2 en varios tipos diferentes de carcinomas broncogénicos, incluyendo adenocarcinomas bien diferenciados, adenocarcinomas pobremente diferenciados y carcinomas epidermoides. Como se muestra en la Figura 22, el

porcentaje de células tumorales que expresaban SIAH2 se incrementó con el grado histológico del tumor, siendo la expresión más elevada en los tumores pulmonares pobremente diferenciados. Además, se hizo evidente una diferencia en la expresión de SIAH2 entre el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma, de modo que la expresión de SIAH2 fue más intensa en el carcinoma epidermoide.

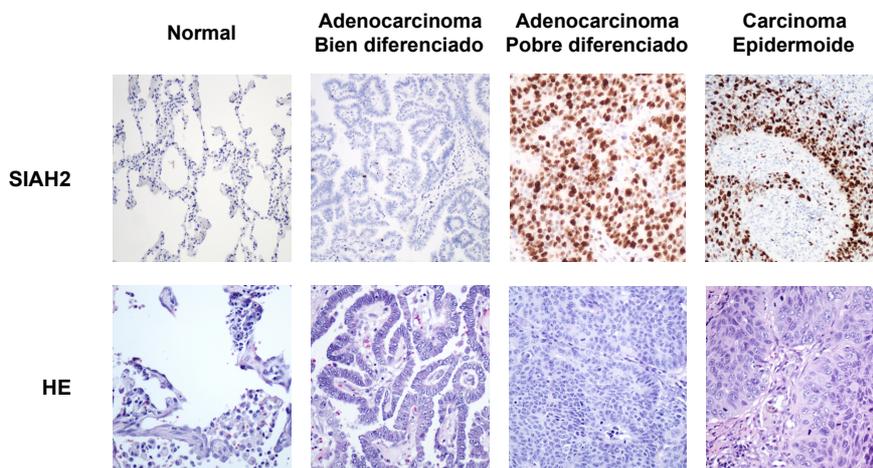


Figura 22: Correlación entre la expresión de SIAH2 y el grado histológico. Se presentan secciones histológicas representativas del análisis inmunohistoquímico de la expresión de SIAH2 en pulmón sano, adenocarcinoma bien diferenciado, adenocarcinoma pobremente diferenciado, y carcinoma epidermoide de pulmón. Se objetivó una tinción ocasional para SIAH2 en el núcleo celular del tejido sano, una tinción moderada en el adenocarcinoma bien diferenciado, y una tinción muy intensa en el adenocarcinoma pobremente diferenciado y en el carcinoma epidermoide. (HE: hematoxilina-eosina)(x100).

2.5. Relación entre la expresión de SIAH2 y las variables clínico-patológicas

Para analizar la repercusión biológica de la expresión de SIAH2 en el cáncer de pulmón, se analizó la posible relación entre las diferentes variables clínico-patológicas y los cambios en los niveles de expresión de SIAH2, a nivel tanto de ARNm como de proteínas, en muestras tumorales comparado con el tejido pulmonar sano. No se incorporaron los datos de la expresión por inmunohistoquímica en el análisis, puesto que la expresión de SIAH2 fue positiva en todas las muestras analizadas. Para la estadificación del cáncer de pulmón se empleó la 7^a última clasificación (7^a Edición) tumor, ganglio, metástasis (TNM), elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) (58). Cabe destacar que se evidenció una fuerte correlación positiva entre la expresión de SIAH2 a nivel de proteína y la captación de ¹⁸F¹⁸FDG (medida como el SUV máximo-maximum standardized uptake value) por el tumor (P=0.014)(Figura 23-A). En el mismo sentido, se encontró una correlación positiva entre el incremento del tamaño del tumor y la captación de ¹⁸F¹⁸FDG en el PET/TC (P=0.012)(Figura 23-B).

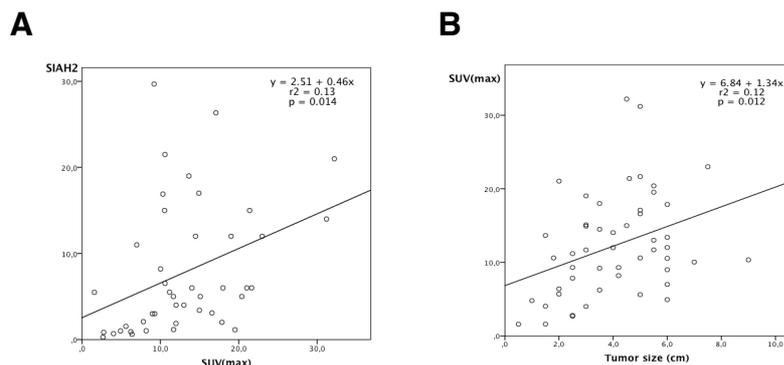


Figura 23: Diagrama de dispersión que muestra los resultados del análisis de correlación de Pearson. A) Correlación positiva entre la expresión de SIAH2 a nivel de proteína y la captación de ^{18}F FDG (medida como SUV máximo) por el tumor en el PET/TC ($P=0.014$), $r^2=0.13$). (B) Correlación positiva entre el creciente tamaño tumoral y la captación de ^{18}F FDG en el PET/CT ($P=0.012$, $r^2=0.12$).

2.6. Estudio de la expresión de DYRK2 en el cáncer de pulmón

Un trabajo previo demostró la existencia de una regulación mutua entre SIAH2 y DYRK2 (137). En concreto, la expresión de SIAH2 facilita la poliubiquitinación y degradación de DYRK2. Para analizar la posible correlación existente entre la expresión proteica de SIAH2 y DYRK2 en el carcinoma broncogénico, se decidió analizar la expresión de DYRK2 en secciones de adenocarcinoma y su correspondiente tejido sano adyacente al tumor. Como se muestra en la Figura 24, la expresión de DYRK2 en el adenocarcinoma estaba disminuida de forma significativa respecto al tejido sano, sugiriendo así que la sobreexpresión de SIAH2 se acompaña de un descenso en la expresión de sus sustratos.

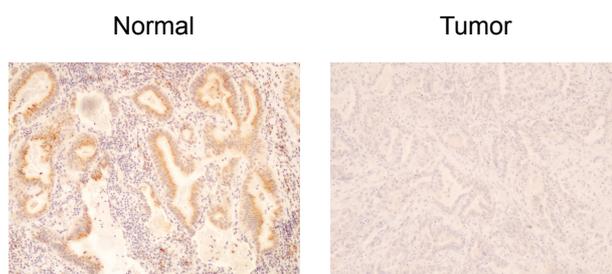


Figura 24: Análisis de la correlación entre la expresión de SIAH2 y DYRK2 por inmunohistoquímica. Secciones histológicas representativas de adenocarcinoma y tejido pulmonar sano adyacente, teñidas con el anticuerpo anti-DYRK2. (x100).

Por último, se procedió a corroborar los resultados obtenidos en tejido humano empleando para ello un modelo *in vitro* de diferenciación. La línea BEAS-2B corresponde a epitelio bronquial humano normal, que conserva la capacidad de diferenciarse a fenotipo de carcinoma epidermoide al ser mantenida en medio de cultivo suplementado con suero. Como se muestra en la Figura 25, se observó una

expresión inversa entre SIAH2 y DYRK2, tanto en las células del epitelio bronquial humano normal, como cuando estas fueron sometidas a diferenciación epidermoide. Del mismo modo, se objetivó que la expresión de DYRK2 estaba reducida de forma significativa en el fenotipo epidermoide comparado con las células epiteliales normales. Por el contrario, los niveles de expresión de SIAH2 se incrementaron significativamente al someter a las células a diferenciación epidermoide. En conjunto, estos resultados indican la existencia de una fuerte asociación entre la expresión de SIAH2 a nivel proteico y el carcinoma broncogénico. Paralelamente, la expresión de los sustratos de SIAH2, como DYRK2, está reducida de forma significativa.

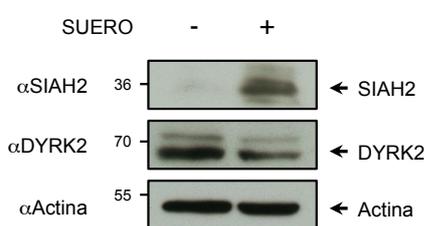


Figura 25: Análisis de la expresión de SIAH2 y DYRK2 por Western-blot, empleando un modelo *in vitro* de diferenciación celular a fenotipo de carcinoma epidermoide de pulmón. Las células BEAS-2B fueron mantenidas en cultivo \pm suero fetal bovino durante 7 días, tras los cuales fueron lisadas para obtener proteínas. Se determinó la expresión proteica por inmunoblot, empleando los anticuerpos primarios frente a SIAH2 y DYRK2 y los correspondientes anticuerpos secundarios. Se muestra un western-blot representativo de 3 experimentos, indicando las posiciones de las proteínas y los correspondientes pesos moleculares en kDa.

2.7. Análisis metabolómico del carcinoma broncogénico

2.7.1. Perfil metabolómico

Se analizaron un total de 136 muestras procedentes de pacientes con carcinoma epidermoide y adenocarcinoma de pulmón (68 procedentes de tumores y otras 68 del tejido sano correspondiente al mismo paciente). Tal y como se muestra en la Tabla 12, se identificaron un total de 800 compuestos conocidos, denominados biomoléculas, en las muestras de carcinoma epidermoide, y 443 en las de adenocarcinoma. En el caso del carcinoma epidermoide, se detectaron cambios significativos en el tejido tumoral frente al sano en 623 metabolitos, mientras que en el adenocarcinoma se detectaron cambios significativos en 271 ($P < 0,05$). Respecto al carcinoma epidermoide, se detectó un incremento significativo en los niveles en 512 compuestos, frente a un descenso en 111. En el adenocarcinoma fueron 223 los metabolitos cuya expresión se vio incrementada de forma significativa, comparado con 48 en los que se vio disminuida. Con un nivel de significación estadística entre 0,05 y 0,10, se identificaron alteraciones en otros 30 metabolitos en el caso del carcinoma

epidermoide y 26 en el adenocarcinoma (25 con aumento de sus niveles y 5, con disminución de los mismos, vs. 23 con aumento de los niveles y 3 con descenso, respectivamente).

Metabolitos con cambios significativos	Ca. Epidermoide/Tejido sano	Adenocarcinoma/Tejido sano
Total metabolitos ($p \leq 0,05$)	623	271
Metabolitos (↑↓)	512/111	223/48
Total metabolitos ($0,05 < p < 0,10$)	30	26
Metabolitos (↑↓)	25/5	23/3

Tabla 12: Comparaciones estadísticas en el estudio de metabolómica de los tumores analizados (tumor vs tejido sano). Se presentan las veces de inducción en el tejido tumoral frente al tejido sano correspondiente, en función de su significación estadística (P).

2.7.2. Metabolismo celular de la glucosa en el cáncer de pulmón

Se detectó un descenso significativo en los niveles de varios compuestos implicados en la glucólisis, tales como glucosa, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, así como de piruvato y lactato, productos finales de la glucólisis (Figura 26). Fue también evidente una elevación de los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato incluyendo la ribosa, xilulosa-5 fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato y ribosa-5-fosfato, así como de sorbitol (generado por reducción de un exceso de glucosa) y de fructosa. Respecto a los metabolitos de la ruta de los ácidos tricarbónicos, se observó una elevación de varios compuestos intermedios tales como fumarato, malato y oxalacetato, en las células neoplásicas.

En el mismo sentido, se evidenciaron otros cambios sugestivos de un incremento en la utilización de glucosa por las células neoplásicas, de forma que las muestras tumorales presentaron una elevación significativa de maltosa, maltotetraosa y maltopentatosa, oligosacáridos reporteros de la síntesis-degradación de glucógeno. Además, se detectó un incremento en los niveles de alcoholes de azúcares (ribulosa, ribosa, ribitol, ribonato, xilulosa, xilonato, xilitol y arabitol), aminoazúcares (N-acetil-glucosamina, N-acetil-glucosamina 6-fosfato, N-acetil galactosamina, N-acetil manosamina y N-acetilneuraminato).

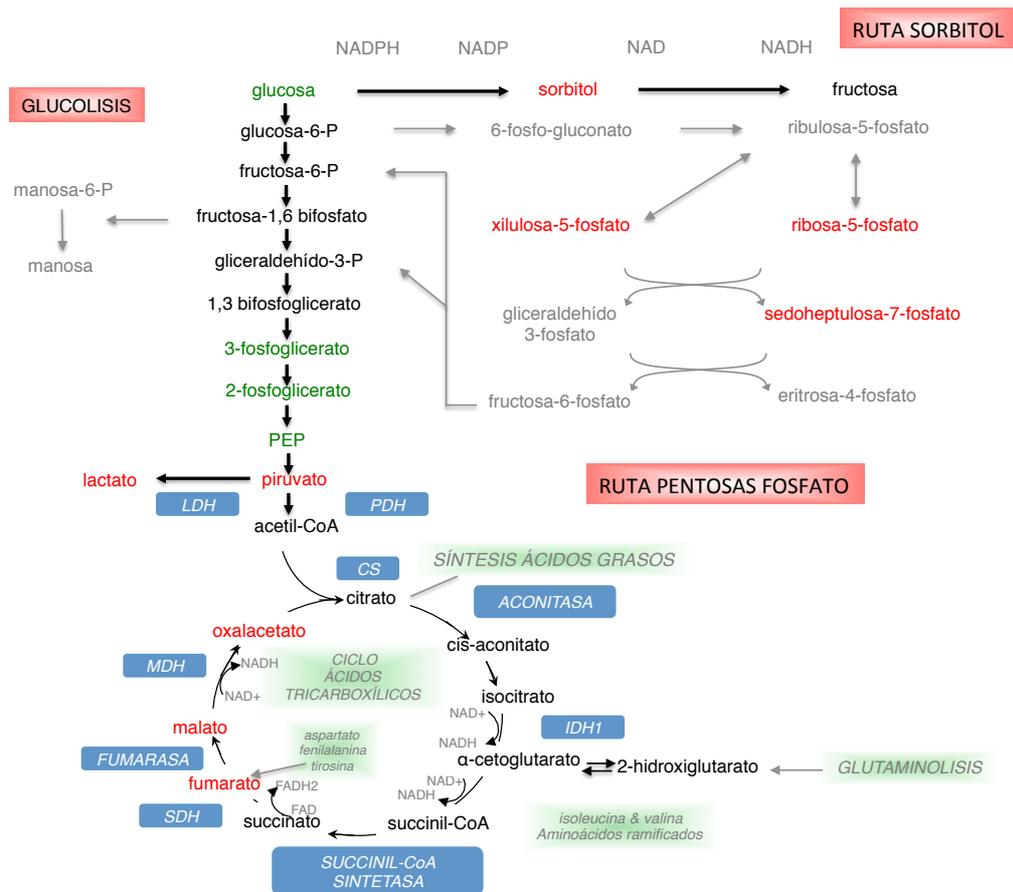


Figura 26: Metabolismo de la glucosa en el cáncer de pulmón. En rojo se muestran los metabolitos sobre-expresados y, en verde, aquellos cuya expresión se vio disminuida, comparando los tumores con el correspondiente tejido sano.

En la siguiente tabla se muestran los diferentes analitos del metabolismo de la glucosa cuya expresión se vio incrementada o disminuida en el carcinoma epidermoide y en el adenocarcinoma de pulmón (Tabla 13).

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
glucosa	0,66	1,55 e ⁻⁶	0,66	0,0002
3-fosfoglicerato	0,19	2,65 e ⁻¹³	0,31	0,0000
2-fosfoglicerato	0,20	2,00 e ⁻¹⁵	0,32	0,0000
fosfoenolpiruvato	0,21	5,90 e ⁻¹⁴	0,24	0,0000
piruvato	2,95	6,29 e ⁻⁵	-	-
lactato	3,55	0,0000	2,23	0,0000
ribosa	5,02	3,67 e ⁻¹⁰	3,31	0,0000
xilulosa-5 fosfato	3,45	4,49 e ⁻⁷	1,81	0,0106
sedoheptulosa-7-fosfato	1,63	0,0148	1,31	0,4474
ribosa-5-fosfato	6,38	4,17 e ⁻⁶	1,90	0,0503
sorbitol	2,83	2,00 e ⁻⁴	5,07	0,0000
fumarato	2,05	9,26 e ⁻⁷	1,23	0,1975
malato	1,53	2,33 e ⁻⁶	2,17	0,0000
oxalacetato	47,36	5,73 e ⁻⁶	-	-
maltosa	1,14	0,0477	1,20	0,1398
maltotetraosa	1,24	0,0015	1,40	0,0180
maltopentatosa	2,73	0,0833	2,35	0,4230
ribulosa	6,94	6,53 e ⁻⁹	2,57	0,0001
ribitol	7,43	1,97 e ⁻¹⁰	5,30	0,0000
ribonato	6,19	7,14 e ⁻¹⁰	-	-
xilulosa	4,79	2,10 e ⁻¹⁰	1,88	0,0672
xilonato	4,90	8,79 e ⁻⁵	1,42	0,1814
xilitol	5,15	2,27 e ⁻¹²	3,31	0,0000
arabitol	2,77	4,52 e ⁻⁶	3,05	0,0001
Nacetil-glucosamina	4,20	4,86 e ⁻¹¹	1,64	0,2715
N-acetil-glucosamina 6-fosfato	2,60	2,05 e ⁻⁶	1,93	0,1396
N-acetil galactosamina	4,37	2,74 e ⁻⁸	3,29	0,0000
N-acetil manosamina	6,85	3,79 e ⁻¹⁰	-	-
N-acetilneuraminato	2,66	3,29 e ⁻⁶	1,86	0,0238
Fructosa	1,89	0,0024	2,01	0,0024
S-galactoilglutación	10,11	0,0000	3,49	0,0007
Glucosa-6-fosfato	1,73	0,0698	1,32	0,2870
Fructosa-6-fosfato	3,44	0,0000	1,62	0,0159
Acetil-CoA	29,68	0,0000	1,68	0,0121

Tabla 13: Metabolismo de la glucosa en el cáncer de pulmón. En rojo se muestran los metabolitos inducidos y, en verde, los inhibidos.

2.7.3. Niveles de glutatión y otros marcadores de estrés oxidativo en el cáncer de pulmón

El glutatión juega un papel determinante en la defensa antioxidante, la homeostasis redox y detoxificación de toxinas y fármacos. Se detectó un incremento en los niveles de *metionina sulfóxido* (MetO), cisteína-glutatión disulfuro (marcador interno de exposición a radicales libres), así como una elevación dramática en los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado en el tejido tumoral respecto al sano. En el mismo sentido, se detectó una elevación de cistationina y cisteína en los tumores, siendo ambos componentes limitantes de la síntesis de glutatión.

Los gamma-glutamil aminoácidos son generados por la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), que transfiere la porción gamma-glutamil del glutatión a otro aminoácido, regulando así el intercambio intra y extracelular del glutatión. Se observó una elevación en los niveles de los gamma-glutamil aminoácidos gamma-glutamil-cisteína, gamma-glutamil-isoleucina, gamma-glutamil-leucina, gamma-glutamil-treonina, gamma-glutamil-triptófano y gamma-glutamil-valina en el tejido tumoral

respecto al sano. Los niveles de ascorbato y L-dehidroascorbato (forma oxidada de ascorbato) y se encontraron elevados de forma dramática (1085 veces y 85 veces, respectivamente) en las muestras tumorales respecto a las sanas. Igualmente, los niveles de otros antioxidantes como α -tocoferol y γ -tocoferol, ergotioneina y anserina estaban incrementados comparados con el tejido sano (Figura 27).

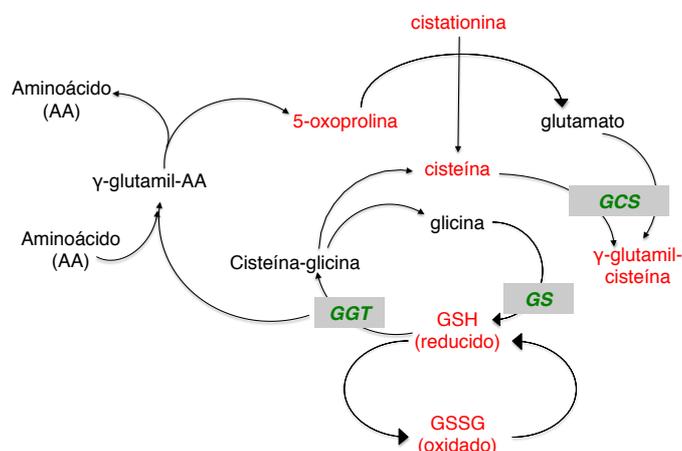


Figura 27: Esquema del metabolismo del glutatión y otros marcadores del estrés oxidativo. En rojo se muestran los metabolitos que aparecieron sobreexpresados en las muestras de cáncer de pulmón.

En la siguiente tabla se muestran los metabolitos de la ruta del glutatión cuya expresión se vio modificada en las muestras de cáncer de pulmón respecto al tejido sano correspondiente (Tabla 14).

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
Metionina sulfóxido (MetO)	1,61	0,0048	1,27	0,0234
cisteína-glutatión disulfuro	3,35	4,13 e ⁻⁵	1,12	0,9256
glutatión reducido	335,11	5,8 e ⁻¹¹	5,67	0,0299
glutatión oxidado	54,66	6,25 e ⁻⁵	1,06	0,1281
cistationina	4,85	4,67 e ⁻⁸	2,45	0,0027
cisteína	9,15	5,87 e ⁻¹⁰	3,18	0,0000
gamma-glutamyl-cisteína	38,34	1,31 e ⁻¹⁰	-	-
gamma-glutamyl-isoleucina	4,40	6,90 e ⁻¹²	-	-
gamma-glutamyl-leucina	2,03	5,00 e ⁻⁴	1,51	0,0040
gamma-glutamyl-treonina	1,64	0,0011	-	-
gamma-glutamyl-triptófano	4,69	8,19 e ⁻⁷	-	-
gamma-glutamyl-valina	4,37	8,77 e ⁻⁸	1,52	0,0532
ascorbato	1085,66	4,72 e ⁻¹⁰	16,97	0,0000
L-dehidroascorbato	84,97	1,73 e ⁻¹³	1,36	0,2392
5-oxoprolina	1,56	0,011	1,03	0,9247
S-metilglutation	15,44	6,09 e ⁻⁵	-	-
α -tocoferol	2,42	1,26 e ⁻⁷	1,85	0,0000
γ -tocoferol	1,78	0,480	1,43	0,0171
Anserina	7,36	6,15 e ⁻⁵	2,51	0,0007
Treonato	0,32	3,41e ⁻¹³	0,38	0,0000

Tabla 14: Metabolitos de la ruta del glutatión. En rojo se muestran los metabolitos sobreexpresados.

2.7.4. Metabolismo de la arginina y poliaminas en el cáncer de pulmón

En la Figura 28 se representan los cambios observados en el metabolismo de la arginina y las poliaminas en el cáncer de pulmón. No se detectó una elevación significativa de arginina o del precursor de poliaminas ornitina en el tejido tumoral respecto al sano. Sin embargo, se observó un acúmulo de putrescina, espermina y espermidina, así como de numerosas moléculas relacionadas con las poliaminas, tales como N(1) acetilespermina, N-acetilputrescina y 5-metiltoadenosina (MTA).

Respecto a los marcadores del remodelado de la matriz extracelular, se evidenció una elevación de prolina, trans-4-hidroxiprolina y prohidroxi-pro, así como de dimetilarginina asimétrica (ADMA) en las muestras tumorales comparado con el tejido sano.

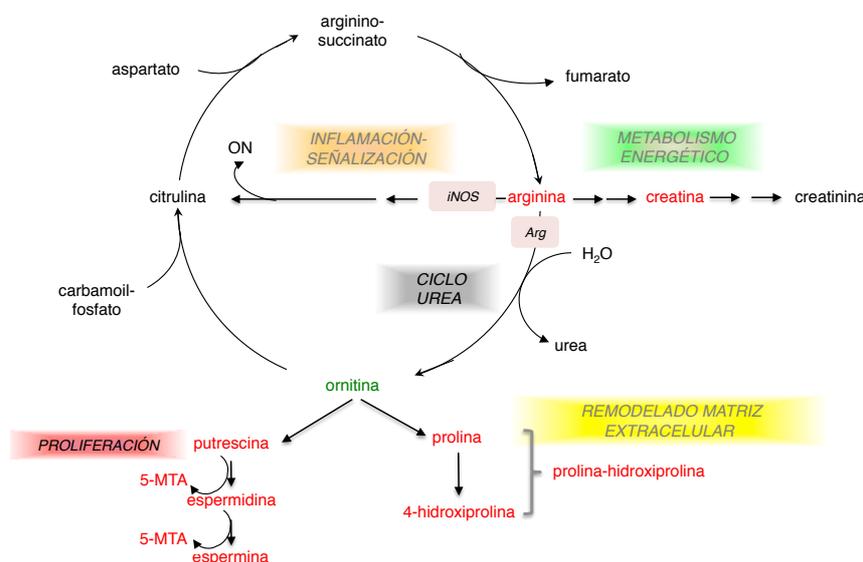


Figura 28. Metabolismo de la arginina en el cáncer de pulmón.

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
arginina	1,13	0,812	1,25	0,1578
ornitina	0,97	0,106	1,02	0,3321
creatina	4,90	7,40 e ⁻¹⁴	1,74	0,0010
putrescina	11,86	8,64 e ⁻¹³	12,01	0,0000
espermina	3,42	0,0051	1,84	0,0014
espermidina	23,05	1,61 e ⁻⁵	1,74	0,0014
N(1) acetilespermina	45,64	9,34 e ⁻¹³	1,00	-
N-acetilputrescina	105,93	5,00 e ⁻¹⁵	2,93	0,0003
5-metiltoadenosina (MTA)	13,77	5,61 e ⁻¹⁰	-	-
prolina	5,57	6,24 e ⁻⁸	1,54	0,0000
trans-4-hidroxiprolina	1,70	1,70 e ⁻¹³	1,64	0,0002
pro-hidroxi-pro	2,84	1,00 e ⁻¹⁵	2,93	0,0000
Dimetilarginina simétrica	4,44	2,63 e ⁻⁸	2,21	0,0001
Sadenosilhomocisteína	5,61	1,72 e ⁻¹⁰	2,68	0,0000
Aspartato	1,02	0,322	0,85	0,0337
Citrulina	1,30	0,330	1,10	0,2540
Fumarato	2,05	0,26 e ⁻⁷	1,23	0,1975

Tabla 15: Metabolismo de la arginina en las muestras de cáncer de pulmón analizadas.

2.7.5. Metabolismo de los ácidos grasos en el cáncer de pulmón

En las células tumorales se objetivó un incremento en los niveles de monoacilglicerol, glicerol y de ácidos grasos de cadena media y larga, todos ellos indicativos de una elevación de la actividad lipolítica en la célula tumoral. Sin embargo, se detectaron también niveles elevados de carnitina y acil-carnitinas como miristoilcarnitina, palmitoilcarnitina, estearoilcarnitina y oleoilcarnitina. Además, observó un incremento significativo en los niveles del cuerpo cetónico 3-hidroxiacetil-CoA en las células tumorales (BHBA). Por el contrario, los niveles de citrato fueron significativamente inferiores en la célula tumoral (Figura 29).

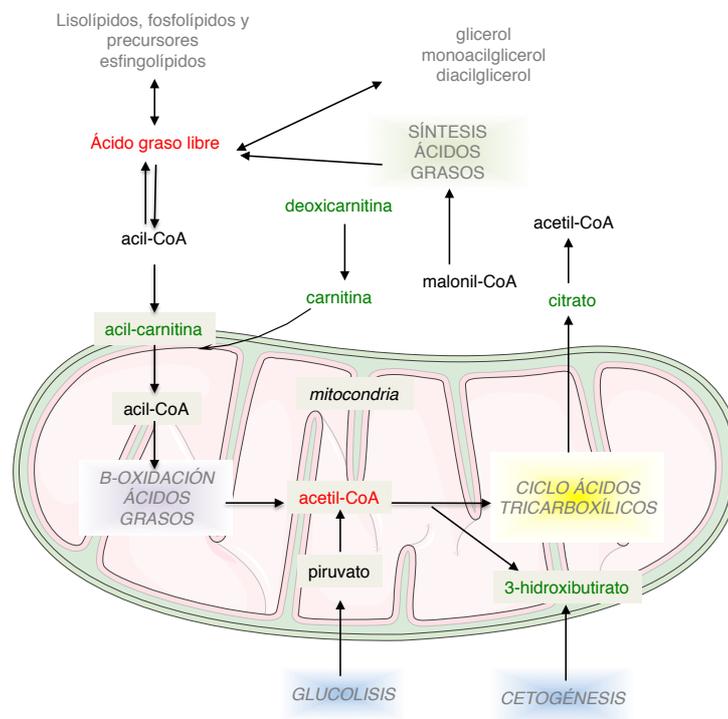


Figura 29: Metabolismo de los ácidos grasos en el cáncer de pulmón.

En la tabla 16 se muestran los analitos del metabolismo de los ácidos grasos que presentaron una expresión significativamente diferente en las muestras tumorales respecto al tejido sano correspondiente.

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
Glicerol	3,24	2,90 e ⁻⁹	1,61	0,0004
Carnitina	0,75	1,28 e ⁻⁵	0,89	0,0320
Miristoilcarnitina	17,79	0,0346	-	-
Palmitoilcarnitina	19,26	0,0010	1,40	0,6216
Estearoilcarnitina	46,16	3,71 e ⁻⁶	2,53	0,1787
Oleoilcarnitina	15,72	0,0154	0,93	0,4553
3-hidrohibutirato (BHBA)	1,25	0,1100	0,89	0,0630
Citrato	0,98	0,0014	0,60	0,0014
1-miristoilglicerol	2,46	8,69 e ⁻⁸	2,25	0,1509
1-palmitoilglicerol	2,23	3,00 e ⁻⁴	1,86	0,0389
2-palmitoilglicerol	16,45	2,41 e ⁻¹⁰	3,56	0,0030
1-estearoilglicerol	1,70	9,95 e ⁻⁵	1,53	0,0072
1-oleoilglicerol	3,48	3,31 e ⁻⁸	3,34	0,0020
2-linoilglicerol	3,78	3,81 e ⁻⁹	6,61	0,0001
1-araquidonoilglicerol	2,31	1,10 e ⁻⁶	1,85	0,0070
2-araquidonoilglicerol	3,64	1,50 e ⁻⁹	1,39	0,5735
Palmitato	1,66	5,94 e ⁻⁶	1,38	0,0036
Palmitoleato	3,52	5,67 e ⁻⁷	2,32	0,0244
Estearato	1,79	1,74 e ⁻¹⁰	1,50	0,0022
Eicosenato	12,05	8,53 e ⁻¹³	3,76	0,0001
Erucato	13,79	6,00 e ⁻¹⁵	4,85	0,0000
Propionilcarnitina	0,76	3,79 e ⁻¹⁵	0,86	0,0065
Octanoilcarnitina	1,56	0,0959	0,41	0,0000
Laurilcarnitina	1,73	0,353	0,59	0,0064
Deoxicarnitina	0,68	1,43 e ⁻⁶	0,70	0,0587
Acetilcarnitina	0,77	7,69 e ⁻⁶	0,78	0,0086

Tabla 16: metabolismo de los ácidos grasos en el cáncer de pulmón.

2.7.6. Marcadores de respuesta inflamatoria en el cáncer de pulmón

Se observó un incremento significativo en los niveles de ácidos grasos esenciales tales como dihomo-linolenato y araquidonato, así como de numerosos precursores eicosanoides (prostaglandina E2, A2, B2) y el metabolito 6-ceto-prostaglandina-F1 α , en el tejido tumoral respecto al sano. También se objetivaron alteraciones en otros mediadores lipídicos como el 13-HODE, 9-HODE y ácido 15-hidroxicostatetranico (15-HETE) (Figura 30).

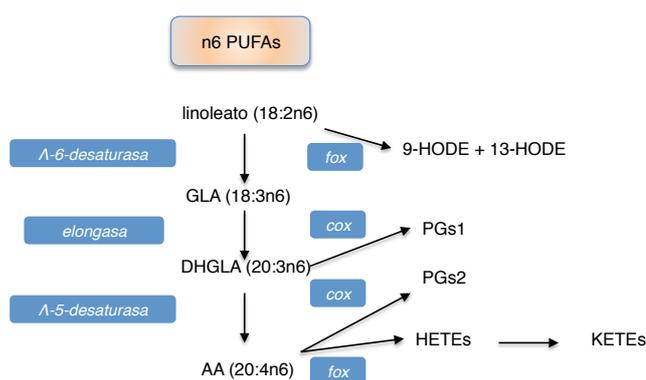


Figura 30: Marcadores de respuesta inflamatoria en el cáncer de pulmón.

En la Tabla 17 se muestran los diferentes metabolitos implicados en la respuesta inflamatoria cuya expresión se vio alterada en las muestras de cáncer de pulmón.

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
N6-araquidonato	2,61	2,68 e ⁻¹⁰	2,33	0,0000
PGE2	9,12	6,00 e ⁻⁴	9,75	0,0426
PGD2	1,23	0,0383	-	-
PGF2a	4,22	6,56 e ⁻⁵	-	-
PGE1	9,23	4,53 e ⁻⁵	-	-
PGA2	-	-	1,33	0,0426
PGB2	-	-	1,64	0,0312
PGF1a	1,84	0,181	1,54	0,7177
15-HETE	8,37	0,884	3,06	0,9860
13-HODE, 9-HODE	3,40	0,481	1,33	0,1846

Tabla 17: Metabolitos implicados en la respuesta inflamatoria con inducción de su expresión en el cáncer de pulmón.

2.7.7. Metabolismo de los fosfolípidos en el cáncer de pulmón

Comparado con el tejido sano, en el tejido tumoral se detectó un acúmulo significativo de glicerol, así como de múltiples metabolitos de fosfolípidos tales como colín-fosfato, fosfoetanolamina, citidina-5'-difosfocolina, glicerolfosforilcolina (GPC) y glicerol-3-fosfato (G3P) (Figura 31).

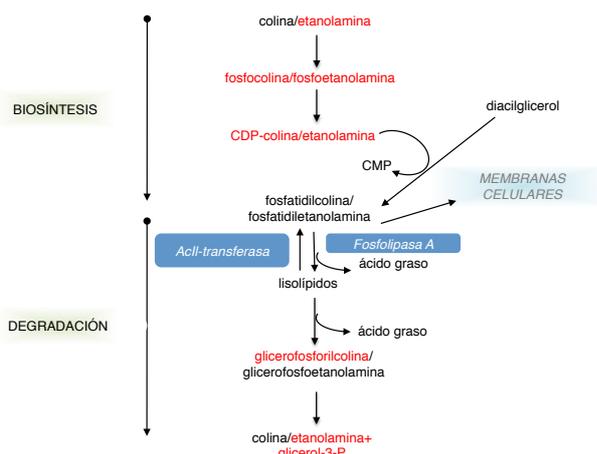


Figura 31: Metabolismo de los fosfolípidos en el cáncer de pulmón.

En la siguiente tabla se muestran los analitos cuya expresión resultó estar alterada de forma significativa en las muestras de cáncer de pulmón (Tabla 18).

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
Glicerol	3,24	2,09 e ⁻⁹	1,61	0,0004
Colín-fosfato	1,91	0,0112	2,60	0,0000
Fosfoetanolamina	1,78	1,32 e ⁻⁶	2,77	0,0012
Citidina 5'difosfocolina	11,97	8,95 e ⁻¹⁰	7,63	0,0000
Glicerolfosforilcolina (GPC)	8,41	8,31 e ⁻¹³	4,08	0,0000
Glicerol 3-fosfato	4,92	3,40 e ⁻¹⁴	1,42	0,0540

Tabla 18: Metabolitos alterados de forma significativa en el metabolismo de los fosfolípidos en las muestras de cáncer de pulmón.

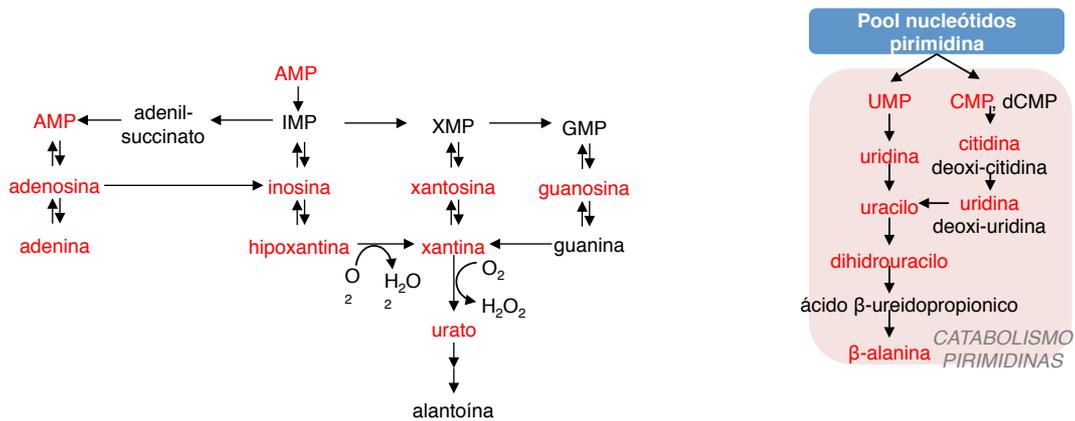


Figura 33: Esquema representativo del catabolismo de los nucleótidos en el cáncer de pulmón.

La Tabla 20 recoge los principales compuestos del catabolismo de los nucleótidos alterados significativamente en el cáncer de pulmón.

Metabolitos	Veces de inducción epidermoide	p	Veces de inducción adenocarcinoma	p
Ribosa 5-fosfato	6,38	4,17 e ⁻⁶	1,90	0,0503
Ribulosa-5-fosfato	3,45	4,49 e ⁻⁷	1,81	0,0106
Adenosina monofosfato (AMP)	10,28	2,36 e ⁻⁷	2,65	0,0048
Adenosina	2,31	0,0002	1,37	0,0060
Guanosina	2,82	4,14 e ⁻⁸	2,11	0,0000
Inosina	3,02	1,82 e ⁻¹¹	2,04	0,0000
Hipoxantina	1,75	4,91 e ⁻⁸	1,22	0,0056
Xantina	5,50	3,00 e ⁻¹²	1,94	0,0056
Xantósina	3,51	1,20 e ⁻⁷	3,44	0,0000
Uridina	2,48	4,00 e ⁻¹²	1,19	0,0164
Citidina	3,41	4,32 e ⁻⁵	1,63	0,0229
Uracil	2,40	3,51 e ⁻⁵	1,85	0,0001
Dihidrouracil	10,26	1,60 e ⁻¹⁴	4,86	0,0000
B-alanina	3,18	7,83 e ⁻⁶	1,60	0,0108
Adenina	4,96	1,88 e ⁻⁸	1,71	0,0032
Urato	1,01	0,563	1,29	0,0157
Alantoina	0,44	1,05 e ⁻¹²	0,59	0,0009
Guanina	0,61	1,14 e ⁻⁶	1,38	0,6944
GMP	126,76	2,37 e ⁻⁵	1,82	0,2675
CMP	3,07	5,11 e ⁻⁸	2,70	0,0000

Tabla 20: Compuestos derivados del catabolismo de los nucleótidos con expresión alterada de forma significativa en las muestras de cáncer de pulmón. Los compuestos con incremento en su expresión se muestran en rojo; los que disminuyeron su expresión, en verde.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LOS MARCADORES PREDICTIVOS EN EL TRASPLANTE PULMONAR

1.1. Análisis de la influencia de las características clínicas del receptor y del donante en los resultados del trasplante pulmonar

El trasplante pulmonar es un tratamiento establecido para las enfermedades pulmonares en fase terminal. Sin embargo, la escasez de donantes válidos sigue siendo un factor limitante a la hora de incrementar el número de trasplantes realizados. Dada la escasez de un bien tan preciado, se han desarrollado una serie de estrategias para expandir el pool de donantes. Así, muchos grupos han comenzado por liberalizar los estrictos criterios de aceptación de donantes pulmonares, con objeto de reducir el gap existente entre la oferta y la demanda (31, 189), empleando pulmones de donantes “añosos” (31, 189-191), con índice de oxigenación bajo (192, 193), infiltrados pulmonares moderados en la radiografía de tórax (31), o muy fumadores (194).

En nuestro estudio, el uso de donantes extendidos no incrementó la necesidad de emplear asistencia circulatoria durante el trasplante, la incidencia de disfunción del injerto o la mortalidad a los 30 días. Cuando se analizaron los resultados al trasplantar pulmones con bajo índice de oxigenación, no se observaron diferencias en los resultados iniciales del trasplante, en cuanto a la mortalidad a los 30 días o la incidencia de PGD. Cabe reseñar, no obstante, que nunca se aceptaron para trasplante injertos con un índice de oxigenación inferior a 300 mmHg. De todas formas, un índice de oxigenación por debajo de 300 mmHg en el momento de la oferta pulmonar no debería de ser considerado como una contraindicación para el trasplante, sino más bien como una oportunidad para comunicarse con el equipo médico del donante, para manejar de forma agresiva al donante potencial (195).

Antes de llevar a cabo este estudio, la impresión clínica del grupo de Trasplante Pulmonar del Hospital Universitario Reina Sofía era que el uso de donantes extendidos no empeoraba los resultados del trasplante siempre y cuando el receptor se encontraba en buen estado clínico, pero que los resultados eran negativos si el receptor se encontraba en muy malas condiciones clínicas en el momento del trasplante.

El posible impacto del trasplante de donantes marginales a receptores en condición crítica (receptor de alto riesgo) no se ha abordado con detalle en la literatura científica. La severidad de la enfermedad en el receptor puede, de hecho, alterar los resultados del trasplante. Así, la ventilación mecánica pre-trasplante se ha asociado a una elevada mortalidad post-trasplante, aunque un trabajo reciente que analizó 8040 trasplantes pulmonares demostró que la supervivencia tras el trasplante pulmonar en pacientes que se encontraban en soporte ventilatorio pre-trasplante estaba condicionada por el diagnóstico del receptor. Según los autores, la patología fibrótica pulmonar incrementaba por 3-5 veces el riesgo de fallecer en los 6 primeros meses tras el trasplante (196). La experiencia inicial de nuestro grupo con el trasplante pulmonar infantil (197) demostró una prevalencia de un 35% de candidatos pediátricos en ventilación mecánica pre-trasplante, comparado con un 10% de adultos. Sin embargo, no se evidenciaron peores resultados en los pacientes bajo soporte ventilatorio, comparado con los que se sometieron al trasplante en situación electiva.

Más que analizar cada uno de estos criterios por separado, lo que se pretendió investigar en el presente trabajo fueron los resultados del trasplante pulmonar en función del estado tanto del donante (óptimo o subóptimo) como del receptor (óptimo o de alto riesgo). Se encontró que en los receptores del Grupo 2 (DO/RE) se llevaron a cabo más trasplantes unipulmonares, y fue necesaria la asistencia circulatoria en casi un tercio de los pacientes, comparado con el Grupo 1 (DO/RO). Además, hubo una tendencia hacia una mayor mortalidad a los 30 días, aunque no significativa. El índice de oxigenación en el receptor, el desarrollo de PGD, o la supervivencia a largo plazo no fue inferior comparado con el grupo más favorable (DO/RO), sugiriendo que, cuando el candidato a trasplante pulmonar se encuentra en buen estado clínico, los resultados tras el trasplante no se ven influenciados negativamente por el uso de donantes marginales. Los resultados observados en el Grupo 4 (DE/RE) apoyan esta aseveración, puesto que, a pesar de tratarse de la peor combinación donante/receptor posible, el índice de oxigenación del receptor a las 24 horas del trasplante, el desarrollo de PGD o la mortalidad a los 30 días no fueron peores que en el Grupo 1 (la combinación donante/receptor "ideal") o el Grupo 3. Sorprendentemente, la mortalidad en el grupo de DO/RE fue incluso peor. Esto contrasta con la experiencia del grupo de Toronto, que encontró que la mortalidad a los 30 días del trasplante era peor cuando se trasplantaban donantes marginales a receptores "estándar" (15,6%), y mucho mayor cuando los receptores no ideales recibían pulmones de donantes extendidos (22,2%) (198).

En el presente trabajo, se observó una tendencia hacia una aparición más tardía del BOS en pacientes que recibieron pulmones óptimos comparado con los que recibieron injertos subóptimos. Por el contrario, la aparición del BOS fue similar entre RE y RO, sugiriendo que, como era de esperar, el desarrollo del BOS es depende más de la calidad del injerto pulmonar que de las características del receptor (199).

Hemos demostrado que la supervivencia a largo plazo del receptor no depende del estado del donante (óptimo o extendido). Sorprendentemente, los receptores extendidos, a diferencia de los óptimos, influenciaron negativamente los resultados a largo plazo del trasplante. Así, se observó una caída brusca de la mediana de supervivencia en los receptores extendidos, desde 8,5 años hasta 2,7 años. En este sentido, serían las propias características del receptor las que influirían de forma determinante en los resultados del trasplante pulmonar. En las últimas décadas, el porcentaje de trasplantes pulmonares realizados en sujetos por encima de los 60 años de edad en el Hospital Reina Sofía se ha incrementado sustancialmente. Puesto que la edad avanzada implica la presencia de comorbilidades asociadas, serían esperables que los resultados tras el trasplante pulmonar fuesen peores comparados con los candidatos más jóvenes. Con lo cual, aunque la edad pueda no constituir en si misma una contraindicación absoluta para el trasplante pulmonar en un sujeto que, por todo lo demás, se encuentre perfectamente “sano”, la presencia de contraindicaciones relativas asociadas a la edad avanzada podrían limitar la obtención de buenos resultados tras el trasplante. En la cohorte analizada, una proporción considerable de receptores extendidos estaban diagnosticados de Fibrosis Pulmonar, una condición clínica que tradicionalmente se ha asociado a peores resultados tras el trasplante pulmonar, comparada con otras indicaciones como el enfisema o la fibrosis quística. En este sentido, Sundaresan y cols. postularon que cierto grado de disfunción pulmonar “reversible” puede ser tolerable en los trasplantes bipulmonares o unipulmonares para pacientes con enfisema. Por el contrario, el injerto pulmonar debería de ser de gran calidad para candidatos con hipertensión pulmonar idiopática, o en trasplantes unipulmonares para pacientes con FPI (31). En nuestra opinión, se pueden emplear de forma segura injertos pulmonares procedentes de donantes extendidos en candidatos óptimos o extendidos. No obstante, existe un subgrupo de receptores, aquellos con FPI e hipertensión pulmonar secundaria, en los que debería evitarse realizar un trasplante unipulmonar empleando un injerto de un donante extendido.

1.2. Impacto de la extracción pulmonar en el donante de origen traumático realizada en las primeras 24 horas sobre la función del injerto y la supervivencia

En el presente trabajo se demuestra que la extracción pulmonar temprana en donantes fallecidos por causa traumática, llevada a cabo en las primeras 24 horas del daño cerebral, no conlleva peor función del injerto ni inferiores resultados iniciales tras el trasplante pulmonar. Además, la supervivencia a medio y largo plazo no se ve comprometida por el uso de estos injertos. Sin embargo, el trasplante pulmonar empleando injertos extraídos de forma temprana de donantes fallecidos por causa traumática sí que se asocia a peor supervivencia a los 5 años.

Hasta la fecha, los donantes en muerte encefálica constituyen la principal fuente de injertos para el trasplante de órganos. No obstante, cabe reseñar que la muerte encefálica se asocia a peor función del injerto en el trasplante renal, hepático, cardíaco o pulmonar. El pulmón es un órgano especialmente vulnerable, y es posible que el daño no llegue a manifestarse hasta después de haber realizado el trasplante. Varios grupos han investigado el impacto de la causa de la muerte del donante en los resultados del trasplante pulmonar, encontrando resultados contradictorios. Así, Waller y cols. (200) encontraron que el uso de donantes traumáticos no influía en la duración de la ventilación mecánica tras el trasplante, el índice de oxigenación a las 24 horas, o la mortalidad a los 30 días. Ciccone y cols. del grupo de San Luís (21) demostraron que los resultados iniciales y la supervivencia a largo plazo eran equivalentes empleando donantes traumáticos y no traumáticos, aunque los receptores de donantes traumáticos desarrollaban más BOS y más episodios de rechazo agudo. En el mismo sentido, una auditoría de los trasplantes cardiopulmonares llevada a cabo en el Reino Unido no encontró ninguna asociación entre la causa de la muerte del donante y la supervivencia a medio plazo tras el trasplante pulmonar (22). Por el contrario, Singhal y cols. (201) analizaron el impacto de la causa de la muerte del donante en los resultados del trasplante de órganos sólidos, empleando datos del UNOS (United Network for Organ Sharing). Los autores encontraron que los accidentes cerebrovasculares se asociaban con peores resultados tras el trasplante, comparado con el traumatismo craneoencefálico. Sin embargo, los pacientes que recibieron injertos pulmonares de donantes fallecidos por anoxia fueron los que mostraron mejor supervivencia y menos rechazo.

Mientras que algunos autores han esgrimido que los injertos procedentes de donantes fallecidos por muerte encefálica deberían ser extraídos de forma temprana, antes de que ocurra más daño debido a la consiguiente respuesta inflamatoria sistémica (202), otros grupos como el de Newcastle (24) han sugerido que retrasar la extracción pulmonar podría ser beneficioso, puesto que el daño subclínico inicial podría mejorar a la vez que el donante potencial es resucitado y estabilizado. Este mismo grupo ha investigado también la contribución del daño pulmonar asociado a la muerte encefálica (edema pulmonar neurogénico) al desarrollo de disfunción del injerto tras la reperusión del injerto. Los autores desarrollaron un modelo en ratas en el que compararon la extracción pulmonar temprana (a los 15 minutos de la muerte encefálica), con la extracción tardía (después de 5 horas), encontrando que la extracción tardía se asociaba con menores cifras de resistencias vasculares pulmonares, con una función del injerto no inferior, así como tampoco mayores niveles de inflamación. Los autores sugirieron la posibilidad de que los pulmones mejoran su función con el tiempo, una vez se atenúa la tormenta simpática en el donante. Trasladando esto al entorno clínico, Wauters y cols. investigaron la influencia de la causa de la muerte del donante (25) y los correspondientes intervalos de tiempo en la supervivencia y la aparición del BOS tras el trasplante pulmonar. Los autores clasificaron las causas de muerte del donante en vasculares, traumáticas y otras (tumores, hipoxia, metabólicas e infecciosas), y compararon los intervalos de tiempo entre el daño cerebral y la muerte encefálica, así como desde la muerte encefálica hasta la perfusión fría, entre los diferentes grupos. La causa de la muerte no se asoció con la mortalidad intrahospitalaria o la supervivencia, pero los receptores de donantes con un intervalo de tiempo entre la muerte encefálica y la perfusión fría superior a 10 horas mostraron mejor supervivencia. Los autores sugirieron que la calidad del injerto pulmonar mejoraría con la existencia de un intervalo de tiempo prolongado entre la tormenta simpática en el donante y la perfusión fría.

En la misma línea que otros trabajos publicados previamente (23), en el presente trabajo se encontró una ligera predominancia hombre a mujer entre los donantes traumáticos para ambos grupos A y B, aunque no significativa. Los donantes traumáticos son predominantemente varones porque este sexo se ve afectado más frecuentemente por los accidentes traumáticos comparado con las mujeres, que fallecen más por accidentes cerebrovasculares. Es importante reseñar que los donantes del Grupo B eran más jóvenes que los del A. Cabría esperar que los donantes jóvenes poseyeran menos comorbilidades comparado con los donantes

“añosos”, lo cual podría explicar por qué los donantes jóvenes estuvieran intubados durante periodos de tiempo más prolongados antes de ser declarados en muerte encefálica. Por otro lado, es obvio que los donantes del Grupo B estuvieran intubados durante más tiempo que los del A, puesto que el criterio de definición para este grupo fue la extracción pulmonar después de 24 horas de la declaración de la muerte encefálica.

En el presente trabajo, la incidencia de PGD es similar a la publicada en el registro internacional (ISHLT) (23). Hubo una tendencia hacia una mayor incidencia del PGD en el Grupo B respecto al A, de modo que hasta un 26% de receptores del Grupo B desarrollaron PGD comparado con un 16% del Grupo A, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De todos modos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del índice de oxigenación de los donantes al estratificar entre la extracción temprana y la tardía. Consecuentemente, se podría especular que los pulmones extraídos de forma tardía mostrarían peor función en el receptor, puesto que, en el tiempo transcurrido desde la declaración de la muerte encefálica hasta la extracción pulmonar, el donante no sería manejado de forma apropiada.

La incidencia de episodios de rechazo agudo fue diferente entre los donantes extraídos de forma temprana y de forma tardía, como se muestra en la Tabla 10. Una posible explicación de este hallazgo podría ser el retraso en la extracción pulmonar después de la muerte encefálica de origen traumática, pero esta aseveración sigue siendo hipotética y merece ser objeto de una investigación más profunda.

No se encontraron diferencias entre la extracción pulmonar temprana o tardía y la supervivencia libre de BOS, tanto en la serie global como al analizar solo los pacientes que sobrevivieron más allá del primer año del trasplante. La supervivencia libre del BOS en el Grupo A fue del 82, 72, 37 and 22%, y en el Grupo B del 78, 68, 42 and 15%, a los 3, 5, 10 y 15 años, respectivamente. Estos resultados coinciden con los publicados previamente por Wauters y cols. (25). También, la auditoría del trasplante cardiaco y pulmonar del Reino Unido, que incluyó 580 trasplantes pulmonares, no encontró ninguna asociación entre la causa de la muerte del donante y el desarrollo de BOS (22). Por el contrario, Ciccone y cols. encontraron una mayor incidencia de BOS entre los receptores de donantes traumáticos, comparado con los no traumáticos (21).

La supervivencia global de la serie mostró una mediana de supervivencia de 5,7 años para el Grupo A, y de 5 años para el Grupo B. Para aquellos receptores que

sobrevivieron más allá del primer año tras el trasplante pulmonar, la probabilidad de supervivencia continuó siendo similar en ambos grupos. Por el contrario, cuando se analizó la supervivencia estratificando por la indicación del trasplante, se encontró una tendencia hacia una peor supervivencia entre los pacientes con fibrosis pulmonar cuando recibieron injertos de donantes traumáticos extraídos de forma temprana (Grupo A), comparado con los pacientes con Fibrosis Quística o EPOC. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, probablemente debido al hecho de que no hubo supervivientes a largo plazo en el Grupo B. La supervivencia actual de los pacientes trasplantados por fibrosis pulmonar al año, 5 y 10 años es del 74, 45 y 22%, respectivamente, unas cifras que son significativamente inferiores que otras etiologías de enfermedad pulmonar terminal sometidas a trasplante pulmonar. Este hecho enfatiza la idea de que los receptores de alto riesgo, como aquellos con FPI, deberían recibir injertos pulmonares de donantes “ideales”, y quizás, extraer pulmones de forma tardía en los donantes fallecidos por causa traumática no sea la mejor estrategia para este subgrupo de receptores.

2. ESTUDIO DE LOS MARCADORES PREDICTIVOS EN EL CÁNCER DE PULMÓN

2.1. Expresión de SIAH2 y DYRK2 en el cáncer de pulmón.

Actualmente, existen datos contradictorios en la literatura científica respecto al papel de SIAH en la progresión tumoral. De modo que resulta de vital importancia investigar cada isoforma de la proteína de manera individual, para poder discriminar el papel predominante de cada una en el desarrollo de las distintas neoplasias. De todas formas, existen datos procedentes de estudios *in vitro*, modelos animales y cohortes de pacientes que han demostrado un papel predominante de SIAH2 como oncogén en tumores sólidos y neoplasias hematológicas (144, 203-206). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, subrayando que el incremento observado en la expresión de SIAH2 depende del grado histológico del tumor.

La importancia del papel de SIAH2 en la carcinogénesis ha sido validada en diferentes trabajos que han intentado modular tanto la abundancia de esta ubiquitin-ligasa como su actividad. Así, Schmidt y cols. (207) construyeron unas proteínas Siah1 y 2 mutantes con inactivación de la actividad E3 ligasa y, por tanto, con bloqueo de la capacidad de auto-ubiquitinación y degradación de sustratos. Los autores

encontraron que la reducción de la función de Siah incrementaba la apoptosis celular y tenía efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral, concluyendo que Siah media la tumorigénesis mediada por Ras en el cáncer de páncreas. El mismo grupo publicó por vez primera en la literatura el primer trabajo que analizaba en detalle el papel de las proteínas SIAH en el cáncer de pulmón (151). Al igual que en el presente trabajo, los autores demostraron una fuerte asociación entre el incremento en la expresión de SIAH y la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, los autores no llegaron a diferenciar entre las 2 isoformas de SIAH (SIAH1 ó SIAH2).

En otro trabajo que analizó el papel de SIAH1 y SIAH2 en un modelo singénico de cáncer de mama (138), los autores observaron que el bloqueo del sitio de unión a sustrato de SIAH daba lugar a una reducción del crecimiento tumoral y de la angiogénesis. Estos resultados coinciden también con los publicados por Qi y cols. (208) en un modelo murino de melanoma. En él, la inhibición de la actividad de SIAH2 mediante la creación de una forma mutante dominante negativa en el anillo de RING, reducía la tumorigénesis, mientras que el bloqueo del sitio de unión a sustrato de SIAH2 reducía la formación de metástasis pero no tenía ningún impacto en la formación de tumores. El mismo grupo investigó también la contribución de SIAH2 en el modelo TRAMP de carcinoma neuroendocrino de próstata (144). Un hallazgo primordial de este trabajo fue que el silenciamiento génico de Siah2 atenuaba el desarrollo de tumores neuroendocrinos de próstata. Además, tanto la frecuencia como el tamaño de las lesiones metastásicas se redujeron también de forma significativa. En la misma línea, en un modelo de cáncer de próstata los autores encontraron que la pérdida de SIAH2 retrasaba la aparición del tumor, reducía la infiltración del estroma, e incrementaba la perfusión del tumor a través de una vasculatura tumoral normalizada, a la vez que disminuía la producción de factores de crecimiento pro-angiogénicos, conduciendo finalmente a un incremento en la sensibilidad del tumor a los fármacos quimioterápicos (204).

Recientemente, Muller y cols. han demostrado cómo SIAH2 acelera la degradación por el proteasoma de TYK2 (Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2), causando una inactivación de STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) en las células del cáncer de pulmón (152). Los autores también demostraron la existencia de una correlación inversa entre la expresión de ambas proteínas en muestras de CPCNP procedentes de diferentes cohortes de pacientes. Además, también evidenciaron que el carcinoma epidermoide de pulmón presenta unos niveles

significativamente superiores de SIAH2 que el adenocarcinoma. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas en el presente trabajo, en el que el análisis por inmunohistoquímica mostró una mayor expresión de SIAH2 en las muestras de carcinoma epidermoide comparado con las de adenocarcinoma. En conjunto, estos resultados subrayan no solo la importancia de la expresión de SIAH2, sino también de algunos de sus sustratos, que juegan papeles clave en la regulación del crecimiento de la célula tumoral y la carcinogénesis.

Nuestro grupo demostró previamente la existencia de una regulación mutua entre DYRK2 y SIAH2, por la cual SIAH2 media la ubiquitinación de DYRK2 y controla su expresión en respuesta a la hipoxia (137). DYRK2 es un miembro de la familia conservada evolutivamente DYRK (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases), las cuales juegan un papel primordial en la ruta de señalización en respuesta al daño al ADN y en la proliferación celular. Aunque el papel de DYRK2 en la progresión tumoral sigue sin estar claro, se ha descrito una menor expresión en los tumores agresivos (209). Nosotros hemos demostrado cómo el incremento en la expresión de SIAH2 suprime la expresión de DYRK2. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el acúmulo de SIAH2 podría correlacionarse inversamente con la expresión de proteínas clave en el control de la progresión tumoral y la invasión de los tejidos, como DYRK2 o STAT3, señalando a SIAH2 como una potencial diana terapéutica.

Por vez primera, en el presente trabajo se ha evaluado la expresión de SIAH2 a diferentes niveles en el cáncer de pulmón, comparándolo con el tejido sano adyacente. Se evidenció la existencia de una tendencia hacia la inducción de SIAH2 a nivel génico en el carcinoma epidermoide de pulmón comparado con el tejido sano, aunque no fue significativa. Por el contrario, no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión génica de SIAH2 en las muestras de adenocarcinoma. Esto contrasta claramente con la expresión de SIAH2 a nivel proteico analizada por western blot, encontrándose que estaba incrementada de forma significativa en el tejido tumoral respecto al sano, tanto en el adenocarcinoma como en el carcinoma epidermoide. Estos resultados apuntan claramente hacia la existencia de alguna alteración a nivel post-transcripcional en las células tumorales de pulmón comparado con el tejido sano. Igualmente, queda subrayada la mayor expresión de SIAH2 a nivel proteico en el subtipo histológico del adenocarcinoma comparado con el carcinoma epidermoide por western blot, puesto que el análisis inmunohistoquímico no reveló diferencias. No obstante, estos

resultados coinciden con un trabajo previo que demostró una mayor expresión de SIAH2 en las muestras de carcinoma epidermoide que en adenocarcinoma mediante técnicas de inmunohistoquímica llevadas a cabo en muestras procedentes de pacientes de 3 cohortes diferentes (152).

2.2. Perfil metabólico del cáncer de pulmón

En el presente estudio, se llevó a cabo un estudio del perfil metabólico en muestras tisulares de pacientes con cáncer de pulmón tipo adenocarcinoma (33 pacientes) y carcinoma epidermoide (35 pacientes), comparándose la expresión de los distintos metabolitos detectados en el tejido tumoral con la observada en el tejido sano correspondiente del mismo paciente. El objetivo de realizar este análisis fue investigar si la patogénesis del cáncer de pulmón conduce a que se produzcan alteraciones en los niveles de analitos de bajo peso molecular, productos finales de diferentes rutas metabólicas, que pudieran ser empleados en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

En ambos subtipos histológicos se detectaron cambios importantes en el metabolismo del glutatión, existiendo un incremento significativo en los niveles de metionina sulfóxido (MetO), cisteína-glutatión disulfuro (marcador interno de exposición a radicales libres), así como una elevación dramática en los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado. En el mismo sentido, se detectó una elevación de cistationina y cisteína en los tumores, siendo ambos componentes limitantes de la síntesis de glutatión. La elevación observada de los gamma-glutamil aminoácidos en los tumores podría indicar un incremento en el turnover de glutatión, secundario a una mayor utilización del mismo en las células tumorales. Además, el dramático incremento detectado en los niveles de ascorbato y L-dehidroascorbato apuntan hacia la existencia de una elevación en el estrés oxidativo celular.

Se detectó una mayor actividad glicolítica en el tejido tumoral, evidenciado por el incremento en los niveles de varios compuestos implicados en la glicolisis, tales como glucosa, el 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, así como de piruvato y lactato, productos finales de la glucolisis. Del mismo modo, se observó una elevación de los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato incluyendo la ribosa, xilulosa-5 fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato y ribosa-5-fosfato, así como de sorbitol y de fructosa. Respecto a la ruta de los ácidos tricarbónicos, se observó una elevación de varios compuestos intermedios, tales como fumarato, malato y oxalacetato. Igualmente se observaron otros cambios sugestivos de un incremento en la utilización de glucosa

por las células neoplásicas, como por ejemplo la elevación de maltotetraosa y maltopentatosa, oligosacáridos reporteros de la síntesis-degradación de glucógeno. Por tanto, la patogénesis del cáncer de pulmón alteraría los metabolitos implicados en la glicolisis y la ruta de los ácidos tricarbónicos, así como de las rutas de señalización relacionadas con ellas. Las células neoplásicas dependen de la glicolisis anaerobia, más que de la fosforilación oxidativa, para la producción energética (165, 170). Las células tumorales emplean también la glutamina como una fuente principal de energía, lo cual les permite mantener la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos durante la proliferación tumoral (210).

Se detectó un incremento en la actividad lipolítica y de la β -oxidación de los ácidos grasos en el tejido tumoral, evidenciado por la elevación en los niveles de monoacilglicerol, glicerol y de ácidos grasos de cadena media y larga, de carnitina y acil-carnitinas, así como de 3-hidroxiacetil-CoA. Mientras que los ácidos grasos de cadena larga (>12 carbonos) se conjugan con la carnitina para facilitar el transporte a la matriz mitocondrial, en donde son sometidos a una β -oxidación para obtener energía, el acúmulo de acil-carnitinas podría ser una indicación del bloqueo en la β -oxidación de los ácidos grasos, lo cual sería consistente con el posible bloqueo que parece existir también en la ruta de los ácidos tricarbónicos. El incremento del 3-hidroxiacetil-CoA sería debido a que el incremento en la lipólisis y de los ácidos grasos libres sería destinado a soportar el crecimiento de la membrana y la proliferación celular, lo cual sería consistente también con el incremento detectado de las poliaminas. De hecho, los niveles de citrato en los tumores fueron más bajos que en tejido sano, lo que iría a favor de la utilización de la síntesis de ácidos grasos para soportar la proliferación de la célula tumoral.

Los fosfolípidos son unos componentes esenciales de la bicapa lipídica de la membrana celular. Se detectó un acúmulo de glicerol y de múltiples metabolitos de fosfolípidos tales como colín-fosfato, fosfoetanolamina, citidina-5'-difosfocolina, glicerolfosforilcolina (GPC) y glicerol-3-fosfato (G3P). El acúmulo de glicerol podría ser indicativo de la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos, lo que explicaría el incremento observado en los niveles de múltiples ácidos grasos. Las modificaciones observadas en el metabolismo de los fosfolípidos reflejarían el crecimiento y recambio tisular en los tumores, y también serían producto de la degradación de las membranas en la apoptosis celular. En conjunto, todos estos hallazgos representarían la potenciación de la hidrólisis lipídica y el remodelado tisular que tendría lugar durante el desarrollo de

estos tumores.

Las prostaglandinas son ácidos grasos esenciales oxidados, que se generan por la ruta de la ciclooxigenasa, y contribuyen a la regulación de múltiples procesos fisiológicos incluidos la inflamación, la diferenciación celular o la vasoconstricción. El incremento observado en los niveles de dihomolinolenato y araquidonato sugieren una mayor disponibilidad de precursores eicosanoides en el cáncer de pulmón. De hecho, la mayor concentración de prostaglandinas E2, A2 y B2 y del metabolito 6-ceto-prostaglandina F1- α podrían alterar el microambiente tumoral. Se ha demostrado que unos niveles aumentados de prostaglandina E2 puede limitar la proliferación de fibroblastos en humanos, incrementar la permeabilidad vascular, y afectar la capacidad para repararse del tejido pulmonar dañado (211). Además, se ha demostrado que el incremento de la prostaglandina B2 induce hipertensión pulmonar (212). Además de los eicosanoides, otros mediadores lipídicos se encontraron alterados en el adenocarcinoma, como el 13-HODE, 9-HODE y 15-HETE. 9-HODE y 13-HODE son productos de la peroxidación lipídica que pueden funcionar como ligandos de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), y han sido relacionados con la progresión de la arteriosclerosis y la hiperalgesia inflamatoria (213). Por el contrario, 15-HETE posee propiedades antiinflamatorias, con lo que podría representar un mecanismo compensatorio para contrarrestar el incremento en la actividad inflamatoria observada.

Se ha relacionado el folato y el metabolismo de las unidades de carbono con el riesgo de desarrollar cáncer, debido a su papel integral en la síntesis del ADN y la metilación (214). En el presente trabajo, se observaron alteraciones en metabolitos pertenecientes a diferentes rutas. Se detectó un incremento en los niveles de glicina, sarcosina, metionina y 5-metil-tetrahidrofolato. También, se detectó un descenso en los niveles de betaína, lo que puede reflejar la existencia de alteraciones en el metabolismo de las unidades de carbono. Además, el acúmulo de sarcosina observado resultaría del aumento en la biogénesis, mediado por la S-adenosilhomocisteína (SAH), y se ha correlacionado con el incremento en la metilación y la agresividad tumoral en otros tipos de neoplasias. El aumento del 5-metiltetrahidrofolato puede ser indicativo de la existencia de un incremento en el pool de unidades de carbono, para soportar la síntesis de nucleótidos. Todo ello sugeriría que el incremento en la sarcosina y la reducción en la betaína contribuirían a la patogénesis del cáncer de pulmón.

La ruta *de novo* de la síntesis de purinas emplea unidades de carbono. Considerando que los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato ribosa 5 fosfato, xilulosa, xilulosa 5 fosfato y adenosina monofosfato (AMP) se encontraron incrementados en el cáncer de pulmón, este hallazgo sugeriría una mayor capacidad en la biogénesis de las purinas, evidenciado además por el acúmulo de adenosina y guanosina, respecto al pulmón sano. De la misma manera, estas alteraciones se deberían a una potenciación del turnover ATP/AMP y de su utilización, puesto que se encontraron mayores niveles de múltiples productos del catabolismo de las purinas tales como la inosina, hipoxantina y la xantosina. La elevación de estos analitos sería indicativa de una alteración en la homeostasis redox, puesto que la síntesis de xantina y de urato se acompañan de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). De forma similar, el aumento observado de la uridina y la citidina se acompañaron de un incremento significativo en los niveles de los catabolitos uracilo, dihidrouracilo y β-alanina. Estos resultados sugieren la existencia de una alteración en el catabolismo de los nucleótidos, que contribuiría a la producción de radicales libres.

Además de la síntesis proteica, la arginina juega un papel clave en el remodelado de la matriz extracelular y en la producción de poliaminas, creatina y óxido nítrico (ON) (215). Aunque no se encontró un incremento significativo en los niveles de arginina en el presente estudio, sí que se detectaron mayores niveles de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina. Las poliaminas poseen actividad anti-glicación y propiedades antioxidantes, estando por tanto aumentada su síntesis en el cáncer de pulmón como mecanismo compensatorio a estos agentes estresantes. Existe evidencia de que la ornitina decarboxilasa (ODC), la enzima responsable de la biogénesis de la putrescina, se encuentra elevada de forma significativa en muchos tipos de cáncer de pulmón, y que la terapia dirigida frente a esta enzima posee propiedades antitumorales en las células del cáncer de pulmón (216). Además, el incremento en los niveles de prolina, trans-4hidroxiprolina y pro-hidroxi-pro podrían deberse a la existencia de un incremento en el remodelado de la matriz extracelular, coincidente con lo observado en el catabolismo de los fosfolípidos. Cabe reseñar que el remodelado tisular se ha correlacionado con un incremento en la mortalidad en otros tipos de tumores (217). Otro hallazgo importante fue el incremento en los niveles de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), la cual se genera a partir de la proteólisis de proteínas conteniendo residuos de metilarginina. Junto con el incremento en los niveles de SAH, reflejaría el aumento en la actividad proteolítica del adenocarcinoma de pulmón. Con lo cual, ADMA limitaría la producción de óxido nítrico y potenciaría la

síntesis de O_2^- y radicales libres. En conjunto, todos estos hallazgos sugieren que el cáncer de pulmón se acompaña de un acúmulo de poliaminas, un remodelado tisular, y una elevación de los niveles de ADMA, que reflejaría la presencia de alteraciones en la homeostasis redox, el remodelado tisular y la función pulmonar.

Las alteraciones del catabolismo de las purinas y del metabolismo de la arginina sugieren que la homeostasis redox estaría alterada en el adenocarcinoma de pulmón. En apoyo de esta hipótesis, se detectó un aumento significativo del antioxidante ascorbato, acompañado de un ligero aumento de su forma oxidada (dehidroascorbato), indicativo de su utilización. Además, se detectó también un acúmulo de los antioxidantes α - y γ -tocoferol, la ergotioneína y la anserina, lo cual representaría una potenciación de la respuesta antioxidante.

CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. Los donantes extendidos pueden emplearse de forma segura para incrementar el pool de donantes pulmonares. Se identificó un subgrupo de candidatos a trasplante pulmonar, los receptores de alto riesgo, que presentan peores resultados que el resto, especialmente aquellos diagnosticados de fibrosis pulmonar. Es esperable que estos receptores tengan peores resultados tras el trasplante pulmonar, independientemente de la calidad del injerto pulmonar.
2. La escasez de donantes para el trasplante pulmonar subraya la necesidad de seleccionar a los candidatos a trasplante de forma estricta, para asegurarse la obtención del máximo beneficio con el procedimiento y un mejor uso de un bien tan escaso.
3. La extracción pulmonar temprana de donantes traumáticos no afecta negativamente los resultados a corto o largo plazo del trasplante pulmonar en pacientes con EPOC o Fibrosis Quística.
4. Por el contrario, el trasplante de injertos extraídos de forma temprana de donantes traumáticos a candidatos con fibrosis pulmonar se asocia a una peor supervivencia a los 5 años.
5. Es imprescindible llevar a cabo un manejo activo y precoz de cualquier donante pulmonar potencial. No seguir esta recomendación podría dar lugar a peores resultados tras el trasplante, especialmente en los candidatos con FPI.
6. Los resultados del presente trabajo indican la existencia de una importante asociación entre la expresión de SIAH2 y el cáncer de pulmón, que se relaciona además con el grado histológico y un descenso en la expresión de algunos de sus sustratos, tales como DYRK2.
7. Estos datos apuntan hacia un posible uso de SIAH2 como marcador diagnóstico y pronóstico en el cáncer de pulmón, de manera que podría convertirse en una diana terapéutica.
8. El análisis del perfil metabólico del cáncer de pulmón sugiere la presencia de alteraciones en la utilización de la glucosa.
9. Se observaron además alteraciones en la oxidación lipídica, que serían debidos a una alteración de la función mitocondrial.
10. Las diferencias encontradas en los niveles de arginina y del metabolismo de los fosfolípidos serían indicativas del remodelado tisular existente en estos tumores, mientras que la potenciación del metabolismo de las unidades de carbono y el incremento en los niveles de ADMA contribuiría a la alteración de

la función pulmonar y a la mayor agresividad del cáncer de pulmón comparado con otros tumores sólidos.

BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Celli BR, MacNee W, Force AET. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004 Jun;23(6):932-46.
2. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005 Nov 26;366(9500):1875-81.
3. Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Cruz AA, Khaltaev N, et al. Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *TEur Respir J* 2010 Nov;36(5):995-1001.
4. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014 Oct;33(10):1009-24.
5. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Nov;154(5):1229-56.
6. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
7. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 1946 Jul;72:62-80.
8. Aurora P, Whitehead B, Wade A, Bowyer J, Whitmore P, Rees PG, et al. Lung transplantation and life extension in children with cystic fibrosis. *Lancet* 1999 Nov 6;354(9190):1591-3.
9. American Thoracic S, European Respiratory S. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jan 15;165(2):277-304.
10. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Oct 1;174(7):810-6.
11. King TE, Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Jr., et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Sep 15;164(6):1025-32.
12. Elicker BM, Golden JA, Ordovas KG, Leard L, Golden TR, Hays SR. Progression of native lung fibrosis in lung transplant recipients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2010 Mar;104(3):426-33.
13. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, Jr. Lung Homotransplantation in Man. *Jama* 1963 Dec 21;186:1065-74.
14. Goldberg M, Lima O, Morgan E, Ayabe HA, Luk S, Ferdman A, et al. A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983 Jun;85(6):821-6. PubMed PMID: 6343728.
15. Coll E, Santos F, Ussetti P, Canela M, Borro JM, De La Torre M, et al. The Spanish Lung Transplant Registry: first report of results (2006-2010). *Arch Bronconeumol* 2013 Feb;49(2):70-8.
16. Punch JD, Hayes DH, LaPorte FB, McBride V, Seely MS. Organ donation and utilization in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant* 2007;7(5 Pt 2):1327-38.

17. Egan TM, Boychuk JE, Rosato K, Cooper JD. Whence the lungs? A study to assess suitability of donor lungs for transplantation. *Transplantation*. 1992 Feb;53(2):420-2. PubMed PMID: 1738937.
18. Orens JB, Boehler A, de Perrot M, Estenne M, Glanville AR, Keshavjee S, et al. A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 2003 Nov;22(11):1183-200.
19. Straznicka M, Follette DM, Eisner MD, Roberts PF, Menza RL, Babcock WD. Aggressive management of lung donors classified as unacceptable: excellent recipient survival one year after transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124(2):250-8.
20. de Perrot M, Snell GI, Babcock WD, Meyers BF, Patterson G, Hodges TN, et al. Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant* 2004 Oct;23(10):1127-34.
21. Ciccone AM, Stewart KC, Meyers BF, Guthrie TJ, Battafarano RJ, Trulock EP, et al. Does donor cause of death affect the outcome of lung transplantation? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 Mar;123(3):429-34; discussion 34-6.
22. Ganesh JS, Rogers CA, Banner NR, Bonser RS. Donor cause of death and medium-term survival after heart transplantation: a United Kingdom national study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 May;129(5):1153-9.
23. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant* 2012 Oct;31(10):1073-86.
24. Avlonitis VS, Wigfield CH, Golledge HD, Kirby JA, Dark JH. Early hemodynamic injury during donor brain death determines the severity of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant* 2007 Jan;7(1):83-90.
25. Wauters S, Verleden GM, Belmans A, Coosemans W, De Leyn P, Nafteux P, et al. Donor cause of brain death and related time intervals: does it affect outcome after lung transplantation? *Eur J Cardiothorac Surg* 2011 Apr;39(4):e68-76.
26. Starnes VA, Barr ML, Cohen RG, Hagen JA, Wells WJ, Horn MV, et al. Living-donor lobar lung transplantation experience: intermediate results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996 Nov;112(5):1284-90; discussion 90-1.
27. Steen S, Ingemansson R, Budrikis A, Bolys R, Roscher R, Sjoberg T. Successful transplantation of lungs topically cooled in the non-heart-beating donor for 6 hours. *Ann Thorac Surg* 1997 Feb;63(2):345-51.
28. Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjoberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2003 Jul;76(1):244-52; discussion 52.
29. Kron IL, Tribble CG, Kern JA, Daniel TM, Rose CE, Truwit JD, et al. Successful transplantation of marginally acceptable thoracic organs. *Ann Surg* 1993 May;217(5):518-22; discussion 22-4.
30. Shumway SJ, Hertz MI, Petty MG, Bolman RM, 3rd. Liberalization of donor criteria in lung and heart-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994 Jan;57(1):92-5.
31. Sundaresan S, Semenovich J, Ochoa L, Richardson G, Trulock EP, Cooper JD, et al. Successful outcome of lung transplantation is not compromised by the use of marginal donor lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995 Jun;109(6):1075-9; discussion 9-80.
32. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005 Oct;24(10):1454-9. PubMed PMID: 16210116.
33. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, Whelan TP, Radosevich DM, Hertz MI, et al. Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007 Oct;26(10):1004-11.

34. Boehler A, Estenne M. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J* 2003 Dec;22(6):1007-18.
35. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
36. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015 Jan;65(1):5-29.
37. Butler CA, Darragh KM, Currie GP, Anderson WJ. Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute? *Respir Med* 2006 Sep;100(9):1642-6.
38. Erridge SC, Moller H, Price A, Brewster D. International comparisons of survival from lung cancer: pitfalls and warnings. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Oct;4(10):570-7.
39. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
40. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung cancer* 2001 Feb-Mar;31(2-3):139-48.
41. Travis W.D. BEMHH, Harris CC. Pathology and Genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. In: Press I, editor. Lyon, France 2004.
42. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995 Jan 1;75(1 Suppl):191-202.
43. Krug LM PM, Kris MG, Rosenzweig K, Travis WD. Small cell and neuroendocrine tumors of the lung. In: DeVita VT LT, Rosenberg SA, editor. DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 848-70.
44. Charloux A, Rossignol M, Purohit A, Small D, Wolkove N, Pauli G, et al. International differences in epidemiology of lung adenocarcinoma. *Lung cancer* 1997 Mar;16(2-3):133-43.
45. Feinstein AR, Wells CK. A clinical-severity staging system for patients with lung cancer. *Medicine* 1990 Jan;69(1):1-33.
46. Hyde L, Hyde CI. Clinical manifestations of lung cancer. *Chest* 1974 Mar;65(3):299-306.
47. Chute CG, Greenberg ER, Baron J, Korson R, Baker J, Yates J. Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancer* 1985 Oct 15;56(8):2107-11.
48. Kuo CW, Chen YM, Chao JY, Tsai CM, Perng RP. Non-small cell lung cancer in very young and very old patients. *Chest* 2000 Feb;117(2):354-7.
49. Chen HC, Jen YM, Wang CH, Lee JC, Lin YS. Etiology of vocal cord paralysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007;69(3):167-71.
50. Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura: an analysis of 96 patients. *Am J Med*. 1977 Nov;63(5):695-702. PubMed PMID: 930945.
51. Eren S, Karaman A, Okur A. The superior vena cava syndrome caused by malignant disease. Imaging with multi-detector row CT. *Eur J Radiol* 2006 Jul;59(1):93-103.
52. Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest P. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007 Sep;132(3 Suppl):149S-60S.
53. Stenbygaard LE, Sorensen JB, Olsen JE. Metastatic pattern at autopsy in non-resectable adenocarcinoma of the lung--a study from a cohort of 259 consecutive patients treated with chemotherapy. *Acta oncologica* 1997;36(3):301-6.
54. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest* 2003 Jan;123(1 Suppl):137S-46S.

55. Oliver TW, Jr., Bernardino ME, Miller JI, Mansour K, Greene D, Davis WA. Isolated adrenal masses in nonsmall-cell bronchogenic carcinoma. *Radiology* 1984 Oct;153(1):217-8.
56. Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, et al. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology* 2007 Mar;242(3):882-8.
57. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac oncol* 2007 Aug;2(8):694-705.
58. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac oncol* 2007 Aug;2(8):706-14.
59. Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, Goldstraw P, Im JG, Tsuboi M, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac oncol* 2007 Jul;2(7):603-12.
60. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac oncol* 2007 Jul;2(7):593-602.
61. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Patz EF, Jr., et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac oncol* 2007 Aug;2(8):686-93.
62. Manser R, Wright G, Hart D, Byrnes G, Campbell DA. Surgery for early stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 (1):CD004699.
63. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S, Jr., et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Thorac oncol* 2004 Jan 15;22(2):330-53.
64. Wistuba, II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl cancer inst* 1997 Sep 17;89(18):1366-73.
65. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Resta O, Carpagnano F, Mule G, et al. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit care Med* 2008 Feb 1;177(3):337-41.
66. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
67. Heguy A, O'Connor TP, Luettich K, Worgall S, Ciecuch A, Harvey BG, et al. Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Apr;84(4):318-28.
68. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 19;1378(1):F21-59.
69. Fong KM, Kida Y, Zimmerman PV, Ikenaga M, Smith PJ. Loss of heterozygosity frequently affects chromosome 17q in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 1995 Oct 1;55(19):4268-72.

70. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Dec;118(6):1136-52.
71. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 2003;54:73-87.
72. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H, Matsuo K, Asano H, Tomii K, et al. Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer research* 2006 Feb 1;66(3):1371-5.
73. Kim JS, Kim JW, Han J, Shim YM, Park J, Kim DH. Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Cancer research* 2006 Apr 15;66(8):4049-54.
74. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, et al. DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 2001 Nov;1(1):61-7.
75. Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, Zelger B, Bihl MP, Foerster A, et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2011 Oct;6(10):1649-57.
76. Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, Kohno T, Skaug V, Bowman ED, et al. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin cancer res* 2011 Apr 1;17(7):1875-82.
77. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, Poyraz BM, Celik G, Sen E, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004 Jul;98(7):632-6.
78. Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer investigation* 2005;23(3):193-200.
79. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004 Aug 20;305(5687):1163-7.
80. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaklopiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008 Oct;9(10):962-72.
81. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009 Dec;4(12):1450-4.
82. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2009 Nov;41(11):1238-42.
83. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, et al. Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One* 2010;5(2):e9112.
84. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2003 Jan;3(1):11-22.
85. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 2005 Aug;6(8):635-45.
86. West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, Harris CC, Dennis PA. Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo. *Cancer research* 2004 Jan 15;64(2):446-51.

87. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer research* 1995 Jul 15;55(14):2988-94.
88. Ito M, Ito G, Kondo M, Uchiyama M, Fukui T, Mori S, et al. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005 Jul 8;225(1):131-9.
89. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, et al. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 2003 Jun 15;63(12):3352-5.
90. Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, et al. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer epidemiol biomark prev* 2008 Mar;17(3):645-54.
91. Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* 2001 Apr;28(2 Suppl 4):3-13.
92. Carretero J, Medina PP, Pio R, Montuenga LM, Sanchez-Cespedes M. Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene. *Oncogene* 2004 May 13;23(22):4037-40.
93. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989 Oct 27;246(4929):491-4.
94. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
95. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research* 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
96. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008;3(7):e2637.
97. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 2009 Mar;7(3):330-8.
98. Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung cancer* 2009 Dec;66(3):275-81.
99. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer research* 2007 May 15;67(10):4827-33.
100. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008 Mar;15(3):504-14.
101. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc natl acad sci* 2009 Sep 22;106(38):16281-6.
102. Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* 2009 Dec;64(12):1082-9.
103. Miura N, Yano T, Shoji F, Kawano D, Takenaka T, Ito K, et al. Clinicopathological significance of Sip1-associated epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer progression. *Anticancer Res* 2009 Oct;29(10):4099-106.
104. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, et al. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin cancer res* 2008 Nov 15;14(22):7430-7.

105. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
106. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997 Nov 5;89(21):1609-15.
107. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl cancer inst* 1995 Jun 21;87(12):895-902.
108. Frias C, Garcia-Aranda C, De Juan C, Moran A, Ortega P, Gomez A, et al. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2008 Jun;60(3):416-25.
109. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc natl acad sci* 1999 Sep 28;96(20):11364-9.
110. Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 2003 Sep 19;278(38):35857-60.
111. Tang AH, Neufeld TP, Kwan E, Rubin GM. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* 1997 Aug 8;90(3):459-67.
112. Carthew RW, Neufeld TP, Rubin GM. Identification of genes that interact with the sina gene in Drosophila eye development. *Proc natl acad sci* 1994 Nov 22;91(24):11689-93.
113. Li S, Li Y, Carthew RW, Lai ZC. Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* 1997 Aug 8;90(3):469-78.
114. Della NG, Senior PV, Bowtell DD. Isolation and characterisation of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina). *Development* 1993 Apr;117(4):1333-43.
115. Holloway AJ, Della NG, Fletcher CF, Largespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia. *Genomics* 1997 Apr 15;41(2):160-8.
116. Hu G, Chung YL, Glover T, Valentine V, Look AT, Fearon ER. Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* 1997 Nov 15;46(1):103-11.
117. Nemani M, Linares-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H, Roperch JP, Tuynder M, Bougueleret L, et al. Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci* 1996 Aug 20;93(17):9039-42.
118. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu rev biochem* 1998;67:425-79.
119. Jones RJ, Chen Q, Voorhees PM, Young KH, Bruey-Sedano N, Yang D, et al. Inhibition of the p53 E3 ligase HDM-2 induces apoptosis and DNA damage-independent p53 phosphorylation in mantle cell lymphoma. *Clin cancer res* 2008 Sep 1;14(17):5416-25.
120. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J cell sci* 2012 Feb 1;125(Pt 3):531-7.
121. Polekhina G, House CM, Traficante N, Mackay JP, Relaix F, Sassoon DA, et al. Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol* 2002 Jan;9(1):68-75.
122. Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, et al. Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J* 2002 Nov 1;21(21):5756-65.

123. Calzado MA, de la Vega L, Moller A, Bowtell DD, Schmitz ML. An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Natu Cell Biol* 2009 Jan;11(1):85-91.
124. Sarkar TR, Sharan S, Wang J, Pawar SA, Cantwell CA, Johnson PF, et al. Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBPdelta expression and contributes to transformation of breast tumor cells. *Mol Cell Biol* 2012 Jan;32(2):320-32.
125. Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol cell* 2001 May;7(5):915-26.
126. Li S, Xu C, Carthew RW. Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sina ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack. *Mol Cell Biol* 2002 Oct;22(19):6854-65.
127. Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997 Oct 15;11(20):2701-14.
128. Fanelli M, Fantozzi A, De Luca P, Caprodossi S, Matsuzawa S, Lazar MA, et al. The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. *J Biol Chem* 2004 Feb 13;279(7):5374-9.
129. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004 Jun 25;117(7):941-52.
130. Zhao HL, Ueki N, Hayman MJ. The Ski protein negatively regulates Siah2-mediated HDAC3 degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Sep 3;399(4):623-8.
131. Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, et al. Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol cell* 2011 Nov 18;44(4):532-44.
132. Kilroy G, Kirk-Ballard H, Carter LE, Floyd ZE. The ubiquitin ligase Siah2 regulates PPARgamma activity in adipocytes. *Endocrinology* 2012 Mar;153(3):1206-18.
133. House CM, Moller A, Bowtell DD. Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways. *Cancer research* 2009 Dec 1;69(23):8835-8.
134. Khurana A, Nakayama K, Williams S, Davis RJ, Mustelin T, Ronai Z. Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *J Biol Chem* 2006 Nov 17;281(46):35316-26.
135. Depaux A, Regnier-Ricard F, Germani A, Varin-Blank N. Dimerization of hSiah proteins regulates their stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Sep 29;348(3):857-63.
136. Calzado MA, De La Vega L, Munoz E, Schmitz ML. From top to bottom: the two faces of HIPK2 for regulation of the hypoxic response. *Cell Cycle* 2009 Jun 1;8(11):1659-64.
137. Perez M, Garcia-Limones C, Zapico I, Marina A, Schmitz ML, Munoz E, et al. Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways. *J Mol Cell Biol*. 2012 Oct;4(5):316-30.
138. Moller A, House CM, Wong CS, Scanlon DB, Liu MC, Ronai Z, et al. Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene* 2009 Jan 15;28(2):289-96.
139. Stebbins JL, Santelli E, Feng Y, De SK, Purves A, Motamedchaboki K, et al. Structure-based design of covalent Siah inhibitors. *Chem Biol* 2013 Aug 22;20(8):973-82.
140. Shah M, Stebbins JL, Dewing A, Qi J, Pellicchia M, Ronai ZA. Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK

signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009 Dec;22(6):799-808.

141. Scortegagna M, Subtil T, Qi J, Kim H, Zhao W, Gu W, et al. USP13 enzyme regulates Siah2 ligase stability and activity via noncatalytic ubiquitin-binding domains. *TJ Biol Chem* 2011 Aug 5;286(31):27333-41.

142. Chan P, Moller A, Liu MC, Sceneay JE, Wong CS, Waddell N, et al. The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Res* 2011;13(1):R19.

143. Behling KC, Tang A, Freydin B, Chervoneva I, Kadakia S, Schwartz GF, et al. Increased SIAH expression predicts ductal carcinoma in situ (DCIS) progression to invasive carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Oct;129(3):717-24.

144. Qi J, Nakayama K, Cardiff RD, Borowsky AD, Kaul K, Williams R, et al. Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* 2010 Jul 13;18(1):23-38.

145. Qi J, Tripathi M, Mishra R, Sahgal N, Fazli L, Ettinger S, et al. The E3 ubiquitin ligase Siah2 contributes to castration-resistant prostate cancer by regulation of androgen receptor transcriptional activity. *Cancer Cell* 2013 Mar 18;23(3):332-46.

146. Brauckhoff A, Malz M, Tschaharganeh D, Malek N, Weber A, Riener MO, et al. Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *J Hepatol* 2011 Nov;55(5):1049-57.

147. Bruzzoni-Giovanelli H, Fernandez P, Veiga L, Podgorniak MP, Powell DJ, Candeias MM, et al. Distinct expression patterns of the E3 ligase SIAH-1 and its partner Kid/KIF22 in normal tissues and in the breast tumoral processes. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:10.

148. Kim H, Jeong W, Ahn K, Ahn C, Kang S. Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Am Soc Nephrol* 2004 Aug;15(8):2042-9.

149. Yoshiyoshi H, Okabe H, Satoh S, Hida K, Kawashima K, Hamasu S, et al. SIAH1 causes growth arrest and apoptosis in hepatoma cells through beta-catenin degradation-dependent and -independent mechanisms. *Oncol Rep* 2007 Mar;17(3):549-56.

150. Wong CS, Moller A. Siah: a promising anticancer target. *Cancer research*. 2013 Apr 15;73(8):2400-6.

151. Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J Natl cancer inst* 2008 Nov 19;100(22):1606-29.

152. Muller S, Chen Y, Ginter T, Schafer C, Buchwald M, Schmitz LM, et al. SIAH2 antagonizes TYK2-STAT3 signaling in lung carcinoma cells. *Oncotarget* 2014 May 30;5(10):3184-96.

153. Kim YS, Maruvada P, Milner JA. Metabolomics in biomarker discovery: future uses for cancer prevention. *Future Oncol* 2008 Feb;4(1):93-102.

154. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin cancer res* 2009 Jan 15;15(2):431-40.

155. O'Connell TM. Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis* 2012 Feb;4(4):431-51.

156. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008 Oct 23;455(7216):1054-6.

157. Ma Y, Zhang P, Yang Y, Wang F, Qin H. Metabolomics in the fields of oncology: a review of recent research. *Mol Biol Rep* 2012 Jul;39(7):7505-11.

158. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Mol cell biol* 2012 Apr;13(4):263-9.

159. Claudino WM, Goncalves PH, di Leo A, Philip PA, Sarkar FH. Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Crit rev oncol hematol* 2012 Oct;84(1):1-7.
160. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001;2(3):155-68.
161. Nordstrom A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010 Mar;5(1):4-17.
162. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature reviews Mol cell biol* 2004 Sep;5(9):763-9.
163. Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature protocols* 2010 Jun;5(6):1019-32.
164. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
165. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009 May 22;324(5930):1029-33.
166. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003 Aug 21;424(6951):952-6. P
167. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006 Feb;4(2):61-70.
168. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988 Apr 8;240(4849):177-84.
169. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001 May 17;411(6835):375-9.
170. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
171. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004 Mar;4(2):189-99.
172. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004 May;22(5):245-52.
173. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005 Oct 10;23(29):7350-60.
174. Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, Williams SR, Noble M. Characteristic metabolic profiles revealed by ¹H NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR Biomed* 1995 Sep;8(6):253-64.
175. Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, Williams SR, Noble MD. Cell type-specific fingerprinting of meningioma and meningeal cells by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research* 1995 Jan 15;55(2):420-7.
176. Giskeodegard GF, Grinde MT, Sitter B, Axelson DE, Lundgren S, Fjosne HE, et al. Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *J Proteome Res* 2010 Feb 5;9(2):972-9.
177. Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res* 2007 Jul;6(7):2605-14.
178. Gottschalk M, Ivanova G, Collins DM, Eustace A, O'Connor R, Brougham DF. Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro (¹H) NMR of whole cells and cellular extracts. *NMR Biomed* 2008 Oct;21(8):809-19.

179. Fan TW, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, et al. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol Cancer* 2009;8:41.
180. Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K, Shinohara M, Hatakeyama Y, Kotani Y, et al. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung cancer* 2011 Nov;74(2):284-92.
181. Kami K, Fujimori T, Sato H, Sato M, Yamamoto H, Ohashi Y, et al. Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* 2013 Apr;9(2):444-53.
182. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006 Jul;25(7):745-55.
183. Sundaresan S, Trachiotis GD, Aoe M, Patterson GA, Cooper JD. Donor lung procurement: assessment and operative technique. *Ann Thorac Surg* 1993 Dec;56(6):1409-13.
184. Alvarez A, Salvatierra A, Lama R, Algar J, Cerezo F, Santos F, et al. Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation. *Transplant proceed* 1999 Feb-Mar;31(1-2):1088-90.
185. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002 Mar;21(3):297-310.
186. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001 Dec;18(6):1059-68. P
187. Yamashita S, Chujo M, Tokuishi K, Anami K, Miyawaki M, Yamamoto S, et al. Expression of dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) can be a favorable prognostic marker in pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009 Dec;138(6):1303-8.
188. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 2008;3(6):1101-8.
189. Bhorade SM, Vigneswaran W, McCabe MA, Garrity ER. Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000 Dec;19(12):1199-204.
190. Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, Hosenpud JD. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999 May;18(5):425-31.
191. Moreno P, Alvarez A, Algar FJ, Cano JR, Espinosa D, Cerezo F, et al. Experience of the Reina Sofia Hospital in lung transplantation from donors older than forty years. *Transplant proceed* 2008 Nov;40(9):3079-81.
192. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Darteville P, Dromer C, Velly JF, et al. Influence of donor characteristics on outcome after lung transplantation: a multicenter study. *J Heart Lung Transplant* 2005 Sep;24(9):1347-53.
193. Zafar F, Khan MS, Heinle JS, Adachi I, McKenzie ED, Schechter MG, et al. Does donor arterial partial pressure of oxygen affect outcomes after lung transplantation? A review of more than 12,000 lung transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012 Apr;143(4):919-25.
194. Oto T, Griffiths AP, Levvey B, Pilcher DV, Whitford H, Kotsimbos TC, et al. A donor history of smoking affects early but not late outcome in lung transplantation. *Transplantation* 2004 Aug 27;78(4):599-606.
195. Alvarez A, Moreno P, Espinosa D, Santos F, Illana J, Algar FJ, et al. Assessment of lungs for transplantation: a stepwise analysis of 476 donors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010 Feb;37(2):432-9.

196. Singer JP, Blanc PD, Hoopes C, Golden JA, Koff JL, Leard LE, et al. The impact of pretransplant mechanical ventilation on short- and long-term survival after lung transplantation. *Am J Transplant* 2011 Oct;11(10):2197-204.
197. Alvarez A, Algar FJ, Santos F, Lama R, Baamonde C, Cerezo F, et al. Pediatric lung transplantation. *Transplant proceed* 2005 Apr;37(3):1519-22.
198. Pierre AF, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH. Marginal donor lungs: a reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 Mar;123(3):421-7; discussion, 7-8.
199. Botha P, Trivedi D, Weir CJ, Searl CP, Corris PA, Dark JH, et al. Extended donor criteria in lung transplantation: impact on organ allocation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006 May;131(5):1154-60.
200. Waller DA, Thompson AM, Wrightson WN, Gould FK, Corris PA, Hilton CJ, et al. Does the mode of donor death influence the early outcome of lung transplantation? A review of lung transplantation from donors involved in major trauma. *J Heart Lung Transplant* 1995 Mar-Apr;14(2):318-21.
201. Singhal AK, Sheng X, Drakos SG, Stehlik J. Impact of donor cause of death on transplant outcomes: UNOS registry analysis. *Transplant proceed* 2009 Nov;41(9):3539-44.
202. van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney international* 2003 Nov;64(5):1874-82.
203. Kramer OH, Stauber RH, Bug G, Hartkamp J, Knauer SK. SIAH proteins: critical roles in leukemogenesis. *Leukemia* 2013 Apr;27(4):792-802.
204. Wong CS, Sceneay J, House CM, Halse HM, Liu MC, George J, et al. Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy. *Cancer research* 2012 Apr 1;72(7):1694-704.
205. Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, et al. Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. *Oncogene* 2009 Aug 20;28(33):2959-68.
206. Malz M, Aulmann A, Samarin J, Bissinger M, Longerich T, Schmitt S, et al. Nuclear accumulation of seven in absentia homologue-2 supports motility and proliferation of liver cancer cells. *Int J cancer* 2012 Nov 1;131(9):2016-26.
207. Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, et al. Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer research* 2007 Dec 15;67(24):11798-810.
208. Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, Goydos JS, Krajewski S, Eroshkin A, et al. The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc Natl acad sci* 2008 Oct 28;105(43):16713-8.
209. Taira N, Mimoto R, Kurata M, Yamaguchi T, Kitagawa M, Miki Y, et al. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J clin invest* 2012 Mar 1;122(3):859-72.
210. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion gene dev* 2008 Feb;18(1):54-61.
211. Failla M, Genovese T, Mazzon E, Fruciano M, Fagone E, Gili E, et al. 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 efficacy on prevention and protection from bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am j resp cell mol biol* 2009 Jul;41(1):50-8.
212. Liu F, Orr JA, Wu JY. Prostaglandin B2-induced pulmonary hypertension is mediated by TxA2/PGH2 receptor stimulation. *Am J Physiol* 1994 Nov;267(5 Pt 1):L602-8. P
213. Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends mol med* 2002 Sep;8(9):422-30.

214. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat rev Cancer* 2013 Aug;13(8):572-83.
215. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat rev Immunol* 2005 Aug;5(8):641-54.
216. Grimminger PP, Schneider PM, Metzger R, Vallbohmer D, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. Ornithine decarboxylase mRNA expression in curatively resected non-small-cell lung cancer. *Clin lung cancer* 2010 Mar 1;11(2):114-9.
217. Markert EK, Levine AJ, Vazquez A. Proliferation and tissue remodeling in cancer: the hallmarks revisited. *Cell death dis* 2012;3:e397.

Extended recipients but not extended donors are associated with poor outcomes following lung transplantation[†]

Paula Moreno^{a,b,*}, Antonio Alvarez^{a,b}, Francisco Santos^a, José Manuel Vaquero^a, Carlos Baamonde^{a,b},
Javier Redel^a, Francisco Cerezo^{a,b}, Francisco Javier Algar^{a,b} and Angel Salvatierra^{a,b}

^a Thoracic Surgery and Lung Transplantation Unit, University Hospital Reina Sofia, Cordoba, Spain

^b Group for the Study of Thoracic Neoplasms and Lung Transplantation, IMIBIC (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba), University of Córdoba, Córdoba, Spain

* Corresponding author. Unidad de Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar, Hospital Universitario Reina Sofia, Avenida Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. Tel: +34-957-010445; e-mail: pmoreno39@gmail.com (P. Moreno).

Received 22 June 2013; received in revised form 25 August 2013; accepted 29 August 2013

Abstract

OBJECTIVES: Extended donors (EDs) are safely used to increase the donor pool in lung transplantation (LT), but their influence in critically ill patients (extended recipients [ERs]) remains controversial. We compared LT outcomes matching optimal donors (ODs) or EDs with optimal recipients (ORs) or ERs.

METHODS: Three hundred and sixty-five LTs were reviewed. ED criteria: age >55, PaO₂/FiO₂ < 350 mmHg, pulmonary infiltrates/purulent secretions and ischaemic times >6 h (single LT [SLT]) and >9 h (double LT [DLT]). ER criteria: pulmonary fibrosis or pulmonary hypertension, pretransplant intubation, age >60 years and bypass >2 h. Four groups were created: Group 1 (OD/OR), Group 2 (OD/ER), Group 3 (ED/OR) and Group 4 (ED/ER). Thirty-day mortality, primary graft dysfunction (PGD), onset of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), long-term survival and other transplant outcomes were compared between OD and ED, OR and ER and among the four groups of study.

RESULTS: There were 151 SLTs and 214 DLTs. Donors: OD (*n* = 229) vs ED (*n* = 136); PGD 8 vs 10% (*P* = 0.43); 30-day mortality 19 vs 20% (*P* = 0.53) and survival (1, 5, 10 and 15 years) 67, 47, 34, 26 vs 69, 53, 46 and 29% (*P* = 0.33). Recipients: OR (*n* = 182) vs ER (*n* = 183); PGD 7 vs 10% (*P* = 0.10); 30-day mortality 15 vs 23% (*P* = 0.04) and survival (1, 5, 10 and 15 years): 73, 57, 46, 30 vs 61, 42, 29 and 23% (*P* = 0.002). Four donor/recipient (D/R) groups: Group 1 (*n* = 122), Group 2 (*n* = 106), Group 3 (*n* = 61), Group 4 (*n* = 76); PGD 10, 6, 3 and 16% (*P* = 0.05); 30-day mortality 13, 26, 19 and 20%, respectively (*P* = 0.13); survival (1, 5, 10 and 15 years) 74, 55, 44 and 35% (Group 1), 55, 39, 22 and 16% (Group 2), 70, 59, 48 and 26% (Group 3) and 68, 47, 37 and 22% (Group 4) (*P* = 0.004). No differences in the onset of BOS were observed among the four study groups.

CONCLUSIONS: LT in critically ill recipients is associated with poor early and long-term outcomes, irrespective of the quality of the donor and length of ischaemic times.

Keywords: Lung transplantation • Lung donor criteria • Marginal donor lungs • Extended donors • Extended recipients • Lung donor pool

INTRODUCTION

Fifty years have passed since Hardy *et al.* [1] performed the first human lung transplantation (LT). Aiming for optimal results, the early transplant surgeons chose ideal donors: young, non-smokers, from the own transplant group, with very short ischaemic times and with PaO₂/FiO₂ ratios >300 mmHg. As the LT procedure matured, transplant groups took more risks and relaxed the previously strict donor criteria, starting to use more marginal donors, after several reports suggesting equivalent outcomes. Meanwhile, as the procedure gained widespread success, the indications expanded significantly, and the number of candidates waiting markedly overweighed the number of available donor lungs. At present, although

LT remains an established therapy for patients with parenchymal and pulmonary vascular lung disease, limited organ supply currently limits this option, and has led to an increased disparity between the number of suitable lung donors and the number of potential recipients, with many patients dying on the waiting lists.

Nowadays, brain-dead donors remain the main source of lung grafts for transplantation, but only 20% of these donors provide lungs suitable for transplantation [2]. A number of strategies have been advocated to expand the lung donor pool. Regarding public education and donor awareness campaigns, Spain is the country with the highest organ donation rate (34.8 per million population-ppm) [3]. However, LT rates in Spain (5 ppm) compare unfavourably with other European countries like Austria (14.3 ppm) and Belgium (10.1 ppm) http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2011.pdf (accessed April 2013). Aggressive medical management of the multiorgan donor has resulted in an increase in the rate

[†]Presented at the 21st European Conference on General Thoracic Surgery, Birmingham, UK, 26–29 May 2013.

of organs offered from 21 to 57%, and in the overall organ procurement rate from 11.5 to 25.5% [4]. Other strategies such as living-lobar LT, organ donation after cardiac death (non-heart-beating donors) and *ex vivo* lung perfusion can also increase the number of organs available, but are technically and logistically demanding, and thus, just a few groups perform them worldwide. Given the desperate need to expand the lung donor pool, transplant centres have relaxed the strict donor-selection criteria with acceptable short-term outcomes [5]. But the possible influence of pre-transplant recipient characteristics on LT outcomes after receiving either an optimal or a marginal donor lung has not been thoroughly addressed. So what is the major concern when transplanting marginal lung grafts: the fear of liberalizing lung donor criteria or of using non-ideal grafts in very ill recipients? To answer this question, we compared LT outcomes matching optimal or extended donors (ODs or EDs) with optimal or extended recipients (ORs or ERs).

PATIENTS AND METHODS

Study population

Three hundred and sixty-five consecutive LTs performed between October 1993 and December 2012 at the Reina Sofia University Hospital were retrospectively reviewed. Eleven retransplantations and 1 heart-LT were not included in the analysis. On occasion, pulmonary twinning procedures were done, so both the lungs of a single donor were transplanted into two separate recipients. EDs were defined as those meeting, at least, two of the following criteria: (i) age >55 years, (ii) PaO₂/FiO₂ < 350 mmHg on 100% oxygen with 5 cmH₂O positive end-expiratory pressure, (iii) pulmonary infiltrates on chest radiograph, (iv) presence of purulent secretions on bronchoscopy, (v) ischaemic times >6 h (if single LT [SLT]) or >9 h (if double LT [DLT]) and (vi) tobacco history >20 pack-years. Donor arterial PO₂ was based on the final measurement before harvesting, rather than the initial measurement at the time of lung offer. Donors with oxygenation ratios <300 mmHg regardless of aggressive resuscitation and management were not considered for transplantation in any case. ODs met all of the traditionally accepted lung transplant donor-selection criteria [6]. We considered a recipient to be 'extended' when having at least one of the following: (i) pulmonary fibrosis or pulmonary hypertension, (ii) age older than 60 years, (iii) on mechanical ventilation before LT and (iv) on cardiopulmonary bypass longer than 2 h. ORs fulfilled all of the standard criteria defined by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [7].

Study design

For the purposes of this study, donors and recipients were classified as optimal or extended, so a total of four groups were created: OD, ED, OR and ER. A subgroup analysis was performed among the four possible combinations: Group 1: OD to OR; Group 2: OD to ER; Group 3: ED to OR and Group 4: ED to ER. Our primary end-points were 30-day mortality, development of primary graft dysfunction (PGD), freedom from bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and survival. Secondary end-points were postoperative complications, need for cardiopulmonary bypass, ICU stay and acute rejection (AR) episodes. Thirty-day mortality, PGD, freedom from BOS, long-term survival and other transplant

outcomes were compared between OD and ED, OR and ER and among the four groups of study.

Donor lung assessment and procurement

Donor and recipient matching with regard to thoracic dimensions and ABO compatibility was performed in every case. Lung donor procurement followed the standard technique of combined cardiopulmonary extraction [8]. The lungs were flushed antegradely via the main PA, venting the perfusate through the left atrial appendage. Once on the back table, an additional retrograde perfusion of the donor lung through the pulmonary veins was performed to optimize lung preservation [9]. Modified Eurocollins® (60 ml/kg; 4°C, 30 cmH₂O) was the preservation solution used until year 2001, when Perfadex® solution (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) was introduced routinely. The use of different lung preservation solutions was equally distributed among the four groups of study.

Lung transplantation procedure

Recipients were chosen by the transplant team on the basis of blood type, size match, recipient status and time on the waiting list. Intraoperative cardiopulmonary support with standard bypass during LT is used selectively at our Institution: (i) during the pneumectomy or the implantation of the first lung graft, when the native lung is not able to maintain adequate gas exchange, or in case of haemodynamic instability. (ii) During the implantation of the second graft, due to the development of graft dysfunction. A fiberoptic bronchoscopy was performed at the end of the procedure to check the status of the bronchial anastomosis and to aspirate secretions.

Postoperative management

Lung transplant recipients received a triple-drug maintenance immunosuppressive regimen consisting of a calcineurin inhibitor (cyclosporine or tacrolimus), plus cell-cycle inhibitors (azathioprine or mycophenolate mofetil) and steroids. Cytolytic therapy was not used systematically. AR episodes were diagnosed by clinical criteria and, on occasion, with the demonstration of perivascular mononuclear cellular infiltrates by transbronchial lung biopsy. The use of different immunosuppression regimens was equally distributed among the four groups of study.

Definitions

PGD was defined following the Statement of the ISHLT [10]. To rule out possible cases with low oxygenation ratios within the first 24 h post-transplant that could improve early thereafter (reperfusion injury, post-transplant pulmonary oedema), we only selected those cases with persistent low PO₂ and pulmonary infiltrates in chest radiographs at 72 h post-transplant (PGD grades 2–3 at 72 h). BOS was graded and defined following the criteria of the ISHLT [11]. For the purposes of this study, BOS grades 2 or 3 were considered for the analysis. Airway complication was defined as a finding of dehiscence, stenosis or malacia of the anastomosis requiring either intervention (surgery, dilatation, debridement, laser therapy or stent placement) or only conservative measures.

Data collection

The medical records of all patients who underwent LT at our Institution from 1993 to 2012 and data from the computerized database were retrospectively reviewed. The donor-related variables included in the analysis were gender, age, ABO blood group, PaO₂/FiO₂ at the time of organ retrieval, duration of mechanical ventilation, ICU stay, the cause of death, smoking history, results of chest X-rays and bronchoscopic findings. The preoperative recipient variables recorded were age, gender, ABO blood group, transplant indication and mechanical ventilation before LT. The intraoperative variables collected were the type of transplantation (SLT/DLT), the need for cardiopulmonary bypass and the ischaemic time of the first and second lung grafts. Postoperative variables analysed were PaO₂/FiO₂ ratio within the first 24 postoperative hours, duration of mechanical ventilation, AR episodes (overall, within 1 month post-transplant, between 2 and 3 months post-transplant and after 3 months post-transplant), freedom from BOS, 30-day mortality and survival.

Statistical analysis

We performed univariate analysis comparing: ODs with ORs; EDs with ORs; ODs with ERs and EDs with ERs. Pearson's χ^2 test and Fisher's exact test were used to assess differences between categorical variables. Unpaired *t*-test was used to compare means between two quantitative variables from normally distributed data, and Mann-Whitney *U*-test for non-normally distributed data. Comparisons of continuous variables among the four groups of gender pairs were done by analysis of variance and *post hoc* Scheffe test.

Survival and freedom from BOS were analysed and compared with those obtained from the Kaplan–Meier method and log-rank test.

Continuous variables are expressed as means \pm standard deviation. Categorical variables are expressed as counts and proportions with 95% confidence intervals (95% CIs). Differences with *P*-values <0.05 were considered significant. The statistical analysis was performed using SPSS (SPSS 20.0 for Mac; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

For the 365 LTs performed, we had 136 (37.2%) EDs compared with 229 (62.8%) ODs. With regard to transplant procedures, there were 214 DLT (58.5%) and 151 SLT (41.5%). Among the EDs, 44 had a smoking history of >20 pack-years (in 17% of donors, data regarding smoking history were not available), 25 were older than 55 years, 24 had a PaO₂/FiO₂ ratio between 300 and 350 mmHg, 66 presented an abnormal chest X-ray, 168 donors presented abnormal bronchoscopic findings, 61 had an ischaemic time for the first graft > 6 h and 18 had an ischaemic time for the second graft >9 h. The main extended criterion among recipients was pulmonary fibrosis or pulmonary hypertension diagnosis (107 cases), followed by age older than 60 years (60 cases), mechanical ventilation pretransplantation (40 cases) and intraoperative cardiopulmonary bypass longer than 2 h (13 cases).

Extended donors vs optimal donors

The comparative analysis of transplant outcomes with regard to donor status (EDs vs ODs) is given in Table 1. Gender distribution was similar between both groups of donors. As they were defining criteria, EDs were older, with lower PaO₂/FiO₂ ratios, with longer graft ischaemic times, and were ventilated for longer periods (Table 1). Lung grafts from EDs were transplanted more frequently

Table 1: Comparative data between EDs and ODs in the transplant series

	EDs (n = 136)	95% CI	ODs (n = 229)	95% CI	P-value
Donor age (years)	38 \pm 16		31 \pm 13		<0.001
Donor cause of death					
Trauma	43 (32.1)	24–40	90 (42.5)	36–48	0.26
Cerebrovascular	66 (49.3)	41–57	85 (40.1)	34–46	
Other	25 (18.7)	12–24	37 (17.5)	12–22	
Donor intubation (h)	54 \pm 54	45–63	37 \pm 34	33–41	<0.001
Donor PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	451 \pm 88	436–466	489 \pm 70	480–498	<0.001
Recipient age (years)	45 \pm 16		40 \pm 17		0.02
Transplant indication					
COPD	53 (39)	29–49	72 (31.4)	25–37	0.08
Pulmonary fibrosis	40 (29.4)	22–36	62 (27.1)	21–33	
Cystic fibrosis	32 (23.5)	16–30	69 (30.1)	24–36	
Other	11 (8)	4–12	26 (11.4)	7–15	
Type of transplant					
Single	70 (51.5)	43–59	81 (35.4)	29–41	0.03
Double	66 (48.5)	40–56	148 (64.6)	58–70	
Need for bypass	24 (17.6)	11–23	48 (21)	16–26	0.44
Ischaemic time first graft (min)	341 \pm 70	329–353	297 \pm 43	292–302	<0.001
Ischaemic time second graft (min)	496 \pm 84	482–510	427 \pm 56	420–434	<0.001
Recipient PaO ₂ /FiO ₂ 24 h (mmHg)	270 \pm 141	246–294	309 \pm 152	289–329	0.04
PGD2–3 at T72	14 (14.1)	8–20	19 (12.7)	9–17	0.73
30-day mortality	27 (19.9)	13–27	45 (19.7)	15–25	0.96

Quantitative variables are expressed as means \pm standard deviation. Qualitative variables are expressed as frequencies and proportions in parentheses (% within each study group). PGD2–3 at T72: primary graft dysfunction grades 2 or 3 at 72 h post-transplant.

into older recipients (recipient mean age of 45 ± 16 years compared with 40 ± 17 years when optimal grafts were used, $P = 0.02$). In addition, the proportion of DLTs performed was lower when the grafts came from EDs, and oxygenation ratios in the recipients of extended grafts were slightly worse than those in optimal grafts. On the contrary, donor cause of death, transplant indication, need for cardiopulmonary bypass, development of PGD and 30-day mortality were not different between both groups of donors (Table 1).

Extended recipients vs optimal recipients

The comparative analysis of transplant outcomes with regard to recipient status (ORs vs ERs) is depicted in Table 2. Gender distribution showed a male-to-female predominance among ERs. Also, ERs were significantly older and received lung grafts from older donors. Mean donor PaO₂/FiO₂ was worse in ERs than in ORs (Table 2). As expected, transplant indication was significantly different in ERs compared with ORs. As pulmonary fibrosis was a defining criterion of ERs in our series, in the groups with ERs, the main LT indication was idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) followed by chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis and others. On the contrary, in the optimal group the main indication was COPD followed by cystic fibrosis and others. Also, the transplant procedure varied between ERs and ORs. Thus, among the ERs, more SLTs were performed compared with ORs (Table 2). Recipient PaO₂/FiO₂ at 24 h post-transplant was worse in the extended group than in the optimal group, and also there was a trend towards an increased 30-day mortality among ERs, although not significant (43 deaths, 23.5% vs 29 deaths, 15.9%). The duration of mechanical ventilation in the donor, donor cause of death, ischaemic time of the first graft and development of PGD was not different between ERs and ORs (Table 2).

Analysis of four donor/recipient groups

Comparative data among all donor/recipient (D/R) pairs are given in Table 3. Overall, gender distribution was similar among the four D/R pairs. Donors were older in the OD/ER, ED/OR and ED/ER groups compared with OD/OR group. The length of donor intubation was also significantly longer in the ED/OR and ED/ER groups compared with OD/OR and OD/ER groups. As expected, transplant indication was significantly different in ERs compared with ORs. Thus, the main indications in both OR groups were cystic fibrosis and COPD, whereas in ER groups, the main indication was pulmonary fibrosis. With regard to the transplant procedure, SLT was the technique of choice for ERs (Table 3).

LT to an ER had a negative impact on the postoperative length of mechanical ventilation and on the mean intensive care unit length of stay. There was a trend towards an increase in the number of AR episodes between the second and third months post-transplant among ED/OR patients (mean: 0.37) and ED/ER patients (mean: 0.22), compared with OD/OR and OD/ER patients (mean: 0.16 and 0.17, respectively), $P < 0.001$. However, no difference was found in the number of AR episodes in the first month post-transplant, after the third month post-transplant or in the total number of AR episodes (data not shown).

There was no difference in donor cause of death, donor PaO₂/FiO₂, recipient age, need for bypass, recipient PaO₂/FiO₂ in the first 24 h, development of PGD and 30-day mortality for the combination of donors and recipients (Table 3).

Bronchiolitis obliterans syndrome

The analysis of BOS included only those recipients surviving the first postoperative year. There was a non-significant trend towards

Table 2: Comparative data between ERs and ORs in the transplant series

	ERs (n = 183)	95% CI	ORs (n = 182)	95% CI	P-value
Donor age (years)	37 ± 14		30 ± 14		<0.001
Donor cause of death					
Trauma	63 (34.5)	27–41	69 (38.3)	31–45	0.20
Cerebrovascular	88 (49.1)	42–56	76 (42.3)	35–49	
Other	32 (16.4)	11–21	37 (19.4)	14–24	
Donor intubation (h)	47 ± 48	40–54	40 ± 38	35–45	0.13
Donor PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	464 ± 75	454–474	483 ± 83	471–495	0.03
Recipient age (years)	47 ± 13		37 ± 17		<0.001
Transplant indication					
COPD	41 (22.4)	16–28	84 (46.2)	39–53	<0.001
Pulmonary fibrosis	102 (55.7)	49–63	0 (0)		
Cystic fibrosis	29 (15.8)	11–21	72 (39.6)	32–46	
Other	11 (6)	3–9	26 (14.2)	9–19	
Type of transplant					
Single	111 (60.7)	54–68	40 (22)	16–28	<0.001
Double	72 (39.3)	32–46	142 (78)	72–84	
Need for bypass	43 (23.5)	17–29	29 (15.9)	11–21	0.06
Ischaemic time first graft (min)	320 ± 60	311–329	309 ± 56	301–317	0.19
Ischaemic time second graft (min)	466 ± 70	456–476	440 ± 73	430–450	0.02
Recipient PaO ₂ /FiO ₂ 24 h (mmHg)	273 ± 144	252–294	313 ± 150	291–375	0.03
PGD2–3 at T72	19 (16.7)	12–22	14 (10.4)	6–14	0.14
30-day mortality	43 (23.5)	17–29	29 (15.9)	11–21	0.06

Quantitative variables are expressed as means ± standard deviation. Qualitative variables are expressed as frequencies and proportions in parentheses (% within each study group). PGD2–3 at T72: Primary graft dysfunction grades 2 or 3 at 72 h post-transplant.

Table 3: Comparative data between D/R matching groups in the transplant series

	Group 1, n = 122 (33)	95% CI	Group 2, n = 106 (29)	95% CI	Group 3, n = 61 (17)	95% CI	Group 4, n = 76 (21)	95% CI	P-value
Donor age (years)	27 ± 12		35 ± 12		37 ± 17		40 ± 15		<0.001
Donor cause of death									
Trauma	51 (44.8)	36–54	38 (40)	31–49	22 (36.7)	25–49	21 (28)	18–38	
Cerebrovascular	43 (37.1)	29–45	41 (43.2)	34–52	25 (41.7)	30–54	42 (56.0)	45–67	
Other	21 (18.1)	11–25	16 (16.8)	10–24	13 (21.7)	12–32	12 (16.0)	8–24	0.44
Donor intubation (h)	36 ± 33	30–42	38 ± 35	31–45	47 ± 47	36–58	49 ± 59	36–62	<0.001
Donor PaO ₂ /FiO ₂ 24 h (mmHg)	497 ± 73	484–510	480 ± 66	467–493	458 ± 93	435–481	445 ± 82	427–463	0.08
Recipient age (years)	35 ± 17		46 ± 16		41 ± 16		48 ± 16		0.17
Transplant indication									
COPD	51 (41.8)	33–51	21 (19.8)	13–27	33 (54.1)	42–66	20 (17.1)	9–25	<0.001
Pulmonary fibrosis	0 (0)		61 (57.5)	48–66	1 (1.6)	0–5	40 (52.6)	41–63	
Cystic fibrosis	53 (43.4)	34–52	16 (15.1)	8–22	19 (31.1)	20–42	13 (17.1)	9–25	
Other	18 (14.7)	9–21	8 (7.5)	2–12	8 (10.1)	3–17	3 (3.9)	0–8	
Type of transplant									
Single	18 (14.8)	9–21	62 (58.5)	49–67	23 (37.7)	26–50	48 (63.2)	53–73	<0.001
Double	104 (85.2)	79–91	44 (41.5)	32–50	38 (62.3)	50–74	28 (36.8)	27–47	
Need for bypass	18 (14.8)	9–21	30 (28.3)	20–36	11 (18.3)	9–27	13 (17.1)	9–25	0.06
Ischaemic time first graft (min)	295 ± 42	288–302	300 ± 43	292–308	335 ± 70	318–352	345 ± 69	330–360	<0.001
Ischaemic time second graft (min)	422 ± 58	412–432	442 ± 49	432–452	492 ± 87	471–513	501 ± 81	484–518	0.001
Recipient PaO ₂ /FiO ₂ 24 h (mmHg)	311 ± 151	284–338	308 ± 154	278–338	316 ± 149	280–352	231 ± 120	205–257	0.17
Postoperative recipient ventilation (h)	69 ± 145	43–95	107 ± 291	50–164	39 ± 40	29–49	104 ± 204	60–148	0.01
ICU stay (days)	11 ± 10	9–13	15 ± 18	12–18	12 ± 12	9–15	13 ± 16	10–16	0.03
PGD2–3 at T72	12 (13.5)	7–19	7 (11.7)	6–18	2 (4.3)	0–9	12 (22.6)	13–31	0.05
30-day mortality	17 (13.9)	8–20	28 (26.4)	18–34	12 (19.7)	10–30	15 (19.7)	11–29	0.13

Group 1: OD/OR; Group 2: OD/ER; Group 3: ED/OR and Group 4: ED/ER. Quantitative variables are expressed as means ± standard deviation. Qualitative variables are expressed as frequencies and proportions in parentheses (% within each study group). PGD2–3 at T72: primary graft dysfunction grades 2 or 3 at 72 h post-transplant.

a delayed onset of BOS in recipients from ODs (median: 9 years [95% CI: 7.5–10.6]) when compared with EDs (median: 6.4 years [95% CI: 4.2–8.6]) ($P = 0.61$) (Fig. 1A). On the contrary, the onset of BOS was similar between ERs and ORs (8 years [95% CI: 5.8–10.1]) vs ER: 8.5 years [95% CI: 6.0–11.1]; $P = 0.35$) (Fig. 1B).

When the four groups of study were compared, subtle differences in the onset of BOS persisted within the OD groups: OD/OR group 8.0 years [95% CI: 5.9–10.1], OD/ER group 9.2 years [95% CI: 6.9–11.3], ED/OR group 6.7 years [95% CI: 4.1–9.4] and ED/ER group 6.4 years [95% CI: 3.2–9.6], $P = 0.54$ (Fig. 1C).

Survival

Actuarial survival of lung transplant recipients according to donor and recipient status is shown in Fig. 2. Interestingly, no significant differences in survival were observed between patients receiving grafts from ODs (median survival: 4.1 years [95% CI: 2.5–5.6]) and those receiving grafts from EDs (median survival: 6.6 years [95% CI: 1.7–11.6]) (Fig. 2A). On the contrary, ERs survived less compared with ORs (median survival: 2.7 years [95% CI: 1.2–4.1] vs 8.5 years [95% CI: 4.7–12.2]; $P = 0.002$) (Fig. 2B). In addition, when the four groups of study were compared, ERs survived less than ERs, irrespective of the quality of the donor (OD/ER: 2.1 years [95% CI: 0–4.4], ED/ER: 3.6 years [95% CI: 0.3–6.9] vs OD/OR: 7.0 years [95% CI: 2.8–11.2] and ED/OR: 9.4 years [95% CI: 3.1–15.7], $P = 0.004$) (Fig. 2C).

DISCUSSION

LT is an established therapy for end-stage lung disease. However, the shortage of suitable donors remains a limiting factor in

increasing the number of LTs performed. Given the scarcity of such an extremely valuable asset, several strategies have been proposed to expand the lung donor pool. Thus, many transplant centres started to liberalize the strict donor-selection criteria to minimize the gap between demand and supply [12,13], using lungs from older donors [12–15], with low PaO₂/FiO₂ [16,17], with mild pulmonary infiltrates on chest X-rays [12] or heavy smokers [18].

In our study, the use of extended criteria donors did not increase the need for cardiopulmonary bypass during the procedure, the incidence of PGD or 30-day mortality. When we analysed our results transplanting donor lungs with low oxygenation ratios, we found that early outcomes were not different in terms of 30-day mortality or incidence of PGD (but in our study, donors with oxygenation ratios below 300 mmHg were not considered for transplantation in any case). Nevertheless, an oxygenation index below 300 mmHg at the time of the organ offer should not be considered a contraindication for LT, but rather an opportunity to communicate with the donor team and to aggressively manage the potential donor [19].

Before doing this study, our clinical impression was that the use of EDs did not impair LT outcomes when the recipient fit well, but did impair the results if the patient was in poor clinical condition. However, the possible impact of using marginal donor lungs in critically ill patients (the high-risk recipient) has not been carefully assessed in the literature. The severity of recipient illness may impact on LT outcomes. Thus, pretransplant mechanical ventilation has been associated with post-transplant mortality, but a recent study of 8040 LT demonstrated that the reduction in post-transplant survival by pretransplant ventilator support is dependent on recipient diagnosis. Patients with underlying fibrotic lung showed 3–5-fold higher odds of death within the first 6 months

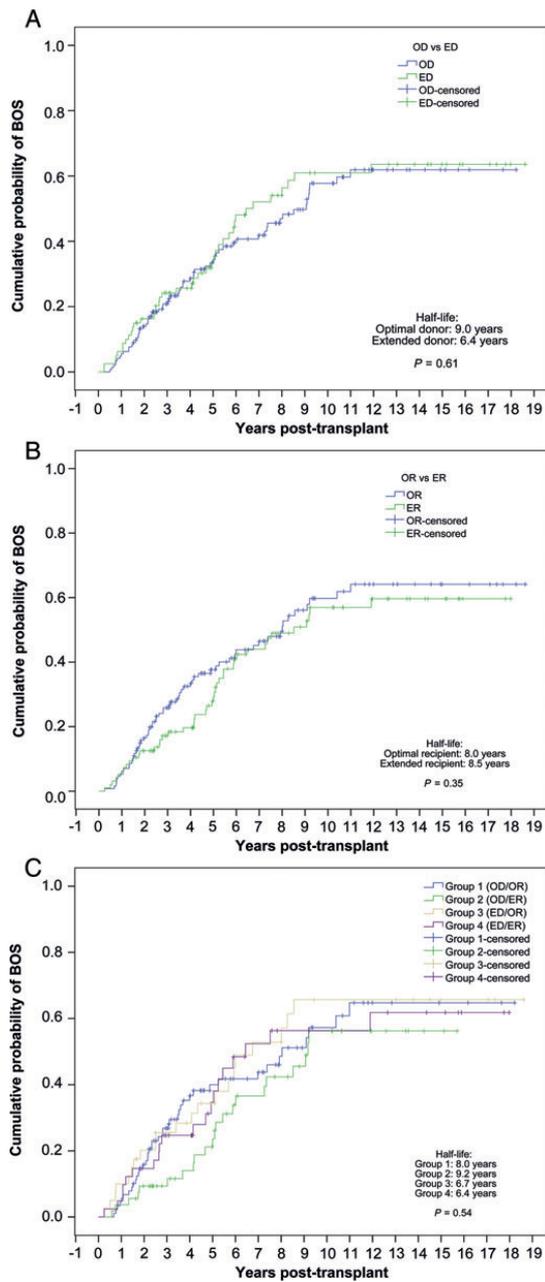


Figure 1: (A) Comparison of cumulative probability of BOS between patients receiving lungs from ODs and those receiving lungs from EDs. (B) Comparison of cumulative probability of BOS between ORs and ERs. (C) Comparison of cumulative probability of BOS among the four groups of study according to donor and recipient characteristics.

post-transplantation [20]. In our early experience with paediatric LT [21], we reported a 35% rate of recipients on mechanical ventilation as opposed to only 10% of adults. However, no deleterious effects of mechanical ventilation were observed in these patients when compared with non-ventilated ones.

Rather than dealing with all these criteria separately, what we really wanted to analyse were the results of LT according to donor status (optimal or marginal) and recipient status (optimal or high

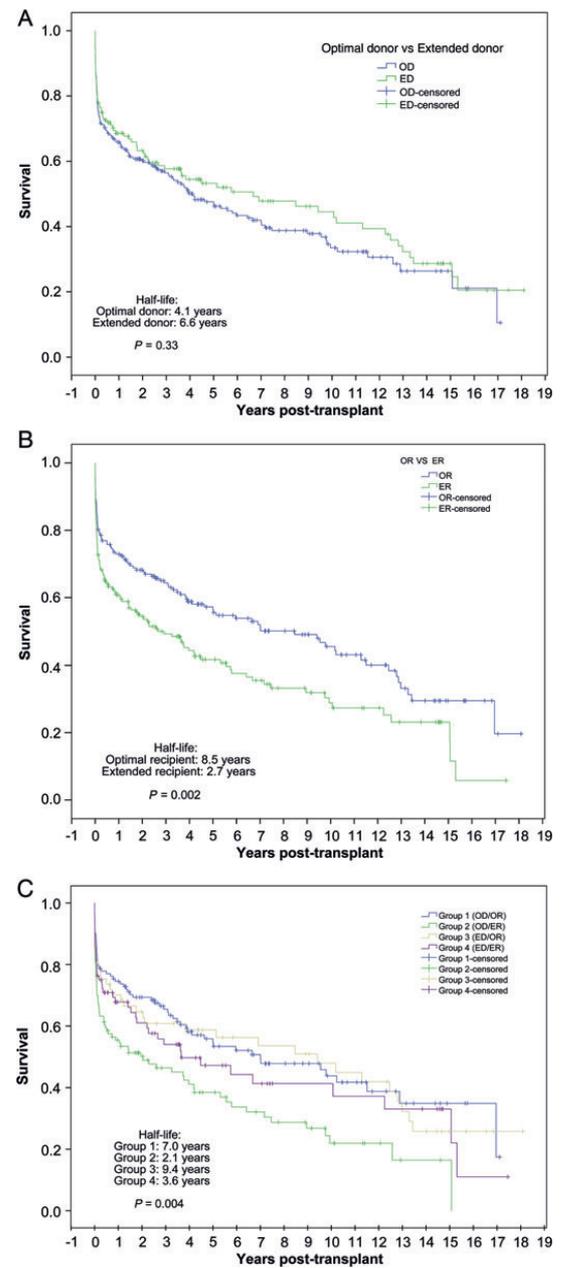


Figure 2: (A) Comparison of survival between patients receiving lungs from ODs and those receiving lungs from EDs. (B) Comparison of survival between ORs and ERs. (C) Comparison of survival among the four groups of study according to donor and recipient characteristics.

risk). We found that among Group 2 (OD/ER), more SLTs were performed, and CPB was needed in nearly one-third of cases, compared with Group 1 (OD/OR). Furthermore, there was a trend towards higher 30-day mortality, although not significant. Recipient PaO₂/FiO₂, development of PGD, 30-day and long-term survival did not compare unfavourably with the OD/OR group, suggesting that when the LT candidate fits well, the outcomes of LT are not impaired with the use of marginal grafts. The results obtained in Group 4 (ED/ER) support this observation as, despite

it was the worst possible donor-to-recipient combination, recipient PaO₂/FiO₂ at 24 h post-transplant, development of PGD and 30-day mortality were not worse than those of Group 1 (the 'ideal' combination) or those of Group 3. Furthermore, mortality in the OD/ER group was even worse. This contrasts with the experience reported by the group of Toronto [22], which found that 30-day mortality was higher when ED lungs were transplanted into 'guideline' recipients (15.6%), and much higher when 'non-guideline' recipients received lungs from EDs (22.2%).

In our study, we observed a trend towards a delayed onset of BOS in patients receiving optimal lung grafts as compared with marginal ones. On the contrary, the onset of BOS was similar between ERs and ORs, suggesting that, as expected, the development of BOS is more dependent on the quality of the donor than on recipient characteristics, as reported previously [23].

We have demonstrated that recipient long-term survival is not influenced by donor status (optimal/extended). Interestingly, ER status as opposed to optimal status negatively influenced long-term outcomes of LT. Thus, we observed an acute drop in ER median survival from 8.5 to 2.7 years. In this sense, we believe that recipient characteristics clearly determine the results of LT. In the last decades, the percentage of LTs performed in adults older than 60 years has increased in our Institution (data not shown). As advancing age itself implies associated comorbidities, one should expect poorer outcomes following LT. It is likely that advancing age itself might not be an absolute contraindication for LT in an otherwise 'healthy' recipient, but the presence of additional relative contraindications might preclude successful outcomes following LT. Note that a considerable number of patients in our ER group were diagnosed with IPF, a condition that has been classically associated with worse outcomes than other indications after LT. In this regard, Sundaresan *et al.* [13] postulated that some degree of reversible lung dysfunction can be tolerable in DLT or in SLT for emphysema. On the contrary, donor graft should be of high quality in case of primary pulmonary hypertension, or in SLT for IPF. In our opinion, marginally acceptable donor lungs can be safely used in both optimal and extended criteria recipients. Nevertheless, there is a subgroup of candidates, those with pulmonary fibrotic disease complicated with secondary pulmonary hypertension, in which SLT using marginal grafts appears to be avoidable.

Several limitations must be considered when evaluating the results reported herein. (i) Data regarding donor smoking history were missing in 17% of cases in our database (typically, in the early years of our programme) and we were not able to obtain them given the retrospective nature of our study. (ii) We designed our study by stratifying donors and recipients according to optimal or extended status, so four possible donor-to-recipient combination groups were created. But it is important to remark that each subject in an extended group may have fulfilled more than two definition criteria, so it is very difficult to determine the impact of each criterion on LT separately. Particularly, IPF patients are usually older and many of them had developed secondary pulmonary hypertension before undergoing LT, leading to an increased use of CPB. (iii) We ignored whether the use of donor lungs with oxygenation ratios of <300 would have impacted on our outcomes following LT, as to date it remains a definite criterion for accepting or rejecting a lung offer. (iv) We did not account for changes in surgical technique, preservation methods and immunosuppressive regimens over time, which could have had some influence on the data analysis. (v) Defining criteria of EDs and ERs, even though following general criteria of previous reports, were chosen arbitrarily. (vi) This study was not designed to determine independent risk factors of poor

outcomes after LT that could be related to donor-recipient status combinations (thus, a multivariate analysis has not been performed), but to analyse the influence of such combinations on four major end-points: 30-day mortality, PGD, BOS and long-term survival. Although we aimed at constructing a homogeneous study group, other confounding factors might have had an influence. These circumstances might have biased the results to some degree but not, in our opinion, to such an extent as would invalidate the main conclusions drawn from the study.

In summary, EDs can be safely used to increase the lung donor pool. However, we identified a subgroup of lung transplant candidates, the high-risk recipients, who behave worse, especially those diagnosed with pulmonary fibrosis. They are expected to have worse outcomes following LT, irrespective of the quality of the lung graft. The shortage of donors for LT highlights the need for strict selection of LT candidates, to ensure that there is a maximum benefit and better use of such a scarce resource.

Funding

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

- [1] Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR. Lung homo-transplantation in man. *JAMA* 1963;186:1065–74.
- [2] Punch JD, Hayes DH, LaPorte FB, McBride V, Seely MS. Organ donation and utilization in the United States, 1996–2005. *Am J Transplant* 2007;7:1327–38.
- [3] Coll E, Santos F, Usetti P, Canela M, Borro JM, De la Torre M *et al.* The Spanish Lung Transplant Registry: first report of results (2006–2010). *Arch Bronconeumol* 2013;49:70–8.
- [4] Straznicka M, Follette DM, Eisner MD, Roberts PF, Menza RL, Babcock WD. Aggressive management of lung donors classified as unacceptable: excellent recipient survival one year after transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:250–8.
- [5] Gabbay E, Williams TJ, Griffiths AP, Macfarlane LM, Kotsimbos TC, Esmore DS *et al.* Maximizing the utilization of donor organs offered for lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:265–71.
- [6] Orens JB, Boehler A, de Perrot M, Estenne M, Glanville AR, Keshavjee S *et al.* A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:1183–200.
- [7] Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ *et al.* International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update—A Consensus Report From the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:745–55.
- [8] Sundaresan S, Trachiotis GD, Aoe M, Patterson GA, Cooper JD. Donor lung procurement: assessment and operative technique. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1409–13.
- [9] Alvarez A, Salvatierra A, Lama R, Algar J, Cerezo F, Santos F *et al.* Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:1088–90.
- [10] Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part II: definition. A Consensus Statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1454–9.
- [11] Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M *et al.* Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:297–310.
- [12] Sundaresan S, Semenkovich J, Ochoa L, Richardson G, Trulock EP, Cooper JD *et al.* Successful outcome of lung transplantation is not compromised by the use of marginal donor lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:1075–80.
- [13] Bhorade SM, Vigneswaran W, McCabe MA, Garrity ER. Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:1200–4.
- [14] Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, Hosenpud JD. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:425–31.

- [15] Moreno P, Alvarez A, Algar FJ, Cano JR, Espinosa D, Cerezo F *et al.* Experience of the Reina Sofia Hospital in lung transplantation from donors older than forty years. *Transplant Proc* 2008;40:3079–81.
- [16] Thabut G, Mal H, Cerrina J, Dartevielle P, Dromer C, Velly JF *et al.* Influence of donor characteristics on outcome after lung transplantation: a multicenter study. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1347–53.
- [17] Zafar F, Khan MS, Heinle JS, Adachi I, McKenzie ED, Schecter MG *et al.* Does donor arterial partial pressure of oxygen affect outcomes after lung transplantation? A review of more than 12,000 lung transplants. *J Thorac Cardiothorac* 2012;143:919–25.
- [18] Oto T, Griffiths AP, Levvey B, Pilcher DV, Whitford H, Kotsimbos TC *et al.* A donor history of smoking affects early but not late outcome in lung transplantation. *Transplantation* 2004;78:599–606.
- [19] Alvarez A, Moreno P, Espinosa D, Santos F, Illana J, Algar FJ *et al.* Assessment of lungs for transplantation: a stepwise analysis of 476 donors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:432–9.
- [20] Singer JP, Blanc PD, Hoopes C, Golden JA, Koff JL, Leard LE *et al.* The impact of pretransplant mechanical ventilation on short- and long-term survival after lung transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:2197–204.
- [21] Alvarez A, Algar FJ, Santos F, Lama R, Baamonde C, Cerezo F *et al.* Pediatric lung transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:1519–22.
- [22] Pierre AF, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH. Marginal donor lungs: a reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:421–8.
- [23] Botha P, Trivedi D, Weir CJ, Searl CP, Corris PA, Dark JH *et al.* Extended donor criteria in lung transplantation: impact on organ allocation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:1154–60.

APPENDIX. CONFERENCE DISCUSSION

Dr J. Dark (Newcastle Upon Tyne, UK): I have no conflicts. You very nicely showed that the extended donor is not as much of a problem as we had thought, and this adds to the increasing international acceptance of this information. I hate looking at registry data, but here is a slide from the ISHLT with data on a very large number of transplants showing that donor age really doesn't have an impact anymore. And I might comment that your donors were not extended according to many international modern terms. The average age was still less than 40; the mean oxygenation index was greater than 400. The commonest reason for deciding that they were extended donors was an abnormal chest X-ray, and you have already indicated that that's a reversible phenomenon. In fact it was demonstrated as long ago as 1995 by the St. Louis group that that could be reversed.

You have, however, demonstrated very clearly, and this is in concordance with international data, that the recipient is important. My criticism is that you have performed a univariate rather than a multivariate analysis. Many of the older patients have interstitial lung disease, have IPS, and they also have pulmonary hypertension, and you cannot disentangle from your analysis which of these is the most important phenomenon.

I would like you to address the question of whether you are identifying some patients who, although falling within acceptable criteria on individual variables, might not be candidates for surgery because they are just too high-risk, the IPF patient who is over 60 with pulmonary hypertension perhaps, and that is particularly important this year when the transplant community is reviewing the international acceptance guidelines.

I would make a minor point that your BOS data really tells us nothing at all. You don't even show a very convincing trend, I don't think. You talk about PGD, and I would be interested to know how you define this. One of my questions, though, is whether there has been a change over 20 years. This is a large cohort from a major centre; it is a 20-year experience. Did you, for instance, look at the first decade compared with the second decade?

Again, this brings us back to the univariate analysis problem. You demonstrate that older patients having IPF have worse outcomes and many of them have single-lung transplants. Can you separate out those various influences? Here is a slide showing that single lungs in general do worse.

However, to come back to the extended donor, there are some specific variables which are emerging as important. This is a slide with some data that we published last year looking at smoking in donors from a very large UK cohort. There is indisputably a disadvantage if your donor smokes. It is not as great as the disadvantage of not having a transplant, as the paper showed. Can I ask how you discussed these particular donor variables with potential recipients? Do you inform them of the problem of the smoking donor so vividly described here?

I think your presentation adds to the body of knowledge, and it is a pleasure to see lung transplantation being discussed at the ESTS.

Dr Moreno: Turning to your question about the influence of the time periods in this series, we have not analysed the impact of time on our experience.

During this time, the main changes we introduced have been the preservation solution and the immunosuppression regimen. We used modified Euro-Collins before 2001 and Perfadex thereafter. Regarding immunosuppression regimens, we switched from cyclosporine to tacrolimus and from azathioprine to mycophenolate in many patients, not in all. However, it seems to me that if any changes did occur during this time, they would have been distributed homogeneously among the four groups of the study, and furthermore, two years ago we published our experience with donor assessment in three periods of time and we did not find any significant differences.

Concerning your question about the multivariate analysis, I agree with you that a multivariate analysis would have given us more information regarding the impact of each variable on lung transplant outcomes. However, the aim of our study was not to analyse the impact of age or smoking history or mechanical ventilation before lung transplantation on our results, because this has been already studied. Many transplant centres have published their results with the use of these donors.

The aim of our study was to know our results when matching the four possible combinations and to identify the candidate who best fits a lung donor. We are performing an additional analysis comparing the survival of fibrotic candidates. Of course, they are old and many of them have secondary pulmonary hypertension. We will analyse their mortality while on the waiting list compared with their survival after lung transplantation.

In relation to the question about the single- or double-lung procedures, I know this is a very controversial issue. If you look at the data of the last ISHLT report, you can see that there is a long-term survival benefit of double-lung transplantation in these recipients. However, our policy is to perform single-lung transplantation in fibrotic recipients unless they are young or have secondary pulmonary hypertension. Furthermore, given the shortage of donors, we try to perform a twinning procedure using the lungs of a single donor in two different recipients whenever possible.

Regarding the last question about smoking, in our series we defined an extended donor as one having a smoking history greater than 20 pack-years. These data were not available for every patient; we didn't know these data in 17% of patients. It seems to me that there is a difference between a 40-year-old donor with a 20 pack-year history, current smoker, and a 60-year-old ex-smoker who gave up smoking 20 years before.

I read with interest the work of the UK transplant group published last year. They compared lung transplant outcomes using smoking donors and non-smoking ones with a cohort of patients awaiting lung transplantation, and their three-year survival was worse when using smoking donors. However, it was better than waiting for a non-smoking one.

Dr M. Hussein (Riyadh, Saudi Arabia): I have one comment. You mentioned the challenge test, the oxygen pressure over FIO₂ less than 350. Normally the standard challenge test is 300 and most of the centres are working on the figure of 300, not 350.

Second, a question. Regarding your donors, did you use prolonged ventilated donors or not, because some centres are putting five days of ventilation as extended donor criteria also. This nine hours of prolonged ischaemic time, what was the highest ischaemic time? You answered the question about the type of preservation solution, but my question is are you also using antegrade and retrograde perfusion, because it is quite a long period, more than nine hours, of ischaemic time.

Dr Moreno: It is our policy to use donors with an oxygenation index not lower than 300–350 mmHg. At the beginning of our programme we were more selective with the use of the donors, so it was nearer to 350 than 300. We also used donors with prolonged mechanical ventilation before lung transplantation. This is one of the extended criteria, and is included in this cohort of patients.

Regarding the nine hours of ischaemic time, we are in a region in the south of Spain in which the distances are quite considerable, and we also have donors in the Canary Islands, which are several thousand kilometres away from our centre. So our ischaemic times are a little bit longer than other groups in Spain.

Regarding the retrograde perfusion, we performed both antegrade and retrograde, and we published it several years previously.

Dr V. Petrauskas (Panevezys, Lithuania): I would like to ask you whether any of the recipients underwent retransplantation during your trial, and if so, were these excluded from the trial?

Dr Moreno: We excluded 11 retransplantations from this analysis.

Dr H. Date (Kyoto, Japan): When you have an extended recipient, very sick, dying, with pulmonary hypertension, whatever, would you like to try to find a good donor or bad donor? A very simple question.

Dr Moreno: Ideally we would like to use a good one. But the problem is that in our series we have a great proportion of recipients who had cystic fibrosis. So we tried to match the ideal donors to these recipients, and obviously the rest of the donors go to fibrotic patients who usually are older. So this is the reason we have more extended donors to extended recipients in our series.

