





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

Departamento de Medicina

Estudios de doctorado: Medicina

## Tesis doctoral

Año de publicación: 2015

Título: *Análisis de polimorfismos en genes que codifican para enzimas que regulan el estrés oxidativo y su relación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón*

**Doctorando:** *Amelia Insa Mollá*

**Directores de tesis:** *Prof. Dra. Ana Lluch Hernández, Dr. José Franco Serrano*



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

Departamento de Medicina

Estudios de doctorado: Medicina

## Tesis doctoral

Año de publicación: 2015

*Título: Análisis de polimorfismos en genes que codifican para enzimas que regulan el estrés oxidativo y su relación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón*

**Doctorando:** *Amelia Insa Mollá*

**Directores de tesis:** *Prof. Dra. Ana Lluch Hernández, Dr. José Franco Serrano*



Los directores:

**Ana LLuch Hernández**, Catedrática de Oncología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefa de Servicio del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**José Franco Serrano**, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe de Sección del Servicio de Neumología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### CERTIFICAMOS

Que la tesis doctoral titulada "*Análisis de polimorfismos en genes que codifican para enzimas que regulan el estrés oxidativo y su relación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón*" ha sido realizada bajo nuestra dirección por Amelia Insa Mollá, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia, y reúne, a nuestro juicio, todos los requisitos para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia.

En Valencia, a 30 de octubre de 2015

Fdo :

Prof<sup>a</sup> Ana LLuch Hernández

Dr José Franco Serrano



## **Agradecimientos**

A mis dos directores de tesis, por su ayuda durante estos años, y porque sin ellos esta tesis no habría sido posible.

A Ana LLuch, por contagiarme su entusiasmo por la oncología y su optimismo infinito.

A José Franco, por creer en este trabajo, por sus aportaciones, sus correcciones y su inmejorable disposición a la hora de ayudarme a realizar este proyecto.

A Vicente Guillem, por su valiosa ayuda desinteresada. Sin su importante colaboración, esta tesis no habría sido posible. Gracias por cederme sin ninguna reticencia tu dedicación y tu esfuerzo.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por hacerme crecer desde el punto de vista profesional, y a Andrés Cervantes, por inculcarme la constancia, y el rigor en el trabajo diario.

A Daría. Gracias por tu colaboración durante meses y tus palabras de aliento.

A Paloma, por tu apoyo y tu paciencia durante estos últimos meses y por ser una gran amiga y compañera.

A Adriana, por tu ayuda y apoyo silenciosos.

A Vicen e Isabel, porque me cuidáis y me hacéis sonreír.

A mi hermana y a mi padre, porque siempre estáis ahí.

A mis hijos, porque hacen que todo tenga un sentido.

A Edu, por tu infinita ayuda con este trabajo, por tu paciencia, por tu sentido del humor, por tus ideas. Por compartir tu vida conmigo.



# ÍNDICE

---



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
1.1. El cáncer de pulmón .....	19
1.1.1. Etiología y factores de riesgo .....	20
1.1.2. Patología y bases moleculares .....	22
1.1.3. Presentación clínica y factores pronósticos .....	25
1.1.4. Principios básicos del tratamiento .....	26
1.2. Estrés oxidativo.....	28
1.2.1. Concepto de estrés oxidativo y radicales Libres.....	28
1.2.2. Sistemas protectores y productores de estrés oxidativo .....	34
1.3. Estrés oxidativo y cáncer de pulmón.....	41
1.4. Importancia del estudio de las variables genéticas del paciente con cáncer de pulmón: impacto en el riesgo, el pronóstico y la eficacia de los tratamientos. ....	44
1.5. Polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo en el cáncer de pulmón .....	48
1.5.1. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la susceptibilidad al cáncer de pulmón .....	50
1.5.2. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la respuesta al tratamiento en cáncer de pulmón .....	52
1.5.3. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón....	54
1.6. Justificación del estudio .....	56
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>61</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
4.1. Ámbito del estudio.....	65
4.2. Diseño del estudio.....	65

4.3.	Población del estudio .....	65
4.4.	Criterios de selección de la población .....	67
4.5.	Variables del estudio .....	68
4.5.1.	Variables demográficas .....	68
4.5.2.	Hábitos tóxicos.....	69
4.5.3.	Características clínicas dependientes del paciente.....	69
4.5.4.	Características clínicas dependientes del tumor .....	70
4.5.5.	Variables dependientes del tratamiento .....	72
4.5.6.	Datos de supervivencia.....	73
4.6.	Estudio de los polimorfismos.....	74
4.6.1.	Extracción del ADN.....	74
4.6.2.	Genotipado de los polimorfismos. Análisis de los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).....	74
4.6.3.	Fundamento de la técnica de genotipado.....	77
4.7.	Análisis estadístico .....	81
4.8.	Justificación ética del estudio .....	85
5.	RESULTADOS.....	89
5.1.	Características de la población .....	89
5.1.1.	Características de la población global:.....	89
5.1.2.	Características de la población con cáncer de pulmón no microcítico.....	93
5.1.3.	Características de la población con cáncer de pulmón microcítico. 97	
5.2.	Características del tratamiento.....	99
5.2.1.	Población global.....	99
5.2.2.	Población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico ....	99
5.2.3.	Población de pacientes con cáncer de pulmón microcítico.....	99

5.3.	Resultados del genotipado .....	100
5.4.	Relación de los polimorfismos con los factores pronósticos clásicos en cáncer de pulmón .....	103
5.4.1.	Población global.....	103
5.4.2.	Población con cáncer de pulmón no microcítico: .....	108
5.5.	Relación de los polimorfismos con la respuesta al tratamiento de combinaciones de quimioterapia basadas en platino .....	112
5.5.1.	Población global.....	112
5.5.2.	Población con cáncer de pulmón no microcítico .....	119
5.6.	Resultados de supervivencia .....	128
5.6.1.	Población global.....	128
5.6.2.	Población con cáncer no microcítico de pulmón .....	138
6.	DISCUSIÓN .....	151
6.1.	Análisis de los resultados .....	153
6.1.1.	Asociación de NCF4 con el estadio y con la supervivencia .....	153
6.1.2.	Asociación de los polimorfismos con la respuesta .....	161
6.2.	Debilidades del estudio .....	165
6.3.	Fortalezas del estudio .....	166
7.	CONCLUSIONES .....	169
	BIBLIOGRAFÍA .....	173



# INTRODUCCIÓN

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón representa un 15% del global de diagnósticos de cáncer y es responsable de un 28% de todas las muertes por cáncer (1). Constituye, por tanto, la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, con una supervivencia global a los cinco años que no suele superar el 15% a pesar de la incorporación de nuevas modalidades de tratamiento en los últimos años (2).

Según los datos más recientes, en los últimos años el cáncer de pulmón ha pasado de ser una enfermedad de hombres durante el siglo XX a constituir lo que se ha definido como una epidemia contemporánea en las mujeres del siglo XXI, debido, en gran parte, a la incorporación más tardía de la mujer al consumo de tabaco.

En España el cáncer de pulmón representa el segundo cáncer más frecuente en hombres y el cuarto más frecuente en mujeres (Figura 1) pero es el que asocia una mayor mortalidad cuando se consideran conjuntamente ambos sexos (20.6%) (3)

Figura 1: Distribución por género del cáncer de pulmón en España

	Hombre	Mujer	Ambos Sexos
1°	Próstata	Mama	Colorrectal
2°	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3°	Colorrectal	Cuerpo de Útero	Pulmón
4°	Vejiga	Pulmón	Mama
5°	Estómago	Ovario	Vejiga

Geográficamente existen patrones dispares de incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón. Tanto la incidencia como mortalidad es significativamente superior en pacientes afroamericanos (4). Por el contrario, en pacientes asiáticos se han constatado tasas de supervivencia superiores a las de los pacientes caucásicos (5).

### 1.1.1. Etiología y factores de riesgo

#### El tabaco

El tabaco representa el factor etiológico más importante y es responsable del 85% al 90% de todos los diagnósticos. El riesgo se incrementa con la cantidad y el tiempo de exposición al tabaco. El riesgo de cáncer de pulmón disminuye al abandonar el tabaco pero incluso con periodos de abstinencia superiores a los 40 años, el riesgo de cáncer de pulmón sigue siendo superior al de la población no expuesta al tabaco (2). Los fumadores pasivos están sometidos a un riesgo entre un 20%-30% superior al de la población no fumadora y se estima que un 25% de los casos de cáncer de pulmón que tienen lugar en población no fumadora están ocasionados por la exposición medioambiental al humo del tabaco (6). Los dos grupos de carcinógenos inhalados más importantes del humo del tabaco incluyen los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las N-nitrosaminas. Ambos compuestos

son activados por el sistema enzimático p450 y ejercen su efecto carcinogénico mediante la formación de aductos de DNA y la inducción de mutaciones en el gen p53 (7).

### **Factores medioambientales**

Los factores medioambientales más relevantes están representados por la exposición laboral a tóxicos, las radiaciones y la contaminación atmosférica y de espacios interiores.

**La exposición laboral a tóxicos**, como el hollín, el alquitrán, el arsénico, el cromo y el níquel también se ha relacionado etiológicamente con el cáncer de pulmón (8, 9). La exposición al asbesto se ha relacionado sólidamente con un incremento del riesgo de cáncer de pulmón y actúa sinérgicamente con el tabaco para producir un marcado aumento de este riesgo (10).

**La radiación** de alta y baja energía lineal transferida (LET) es un factor de riesgo relevante para el cáncer de pulmón. En este sentido la exposición al radón (tanto en la población general, como en determinados entornos laborales) se ha asociado a un riesgo superior para cáncer de pulmón (11, 12). También la exposición a radiación de LET baja como los rayos-X y los rayos-γ se ha relacionado un incremento del riesgo (2).

**La contaminación** atmosférica y de espacios interiores se ha relacionado con un riesgo aumentado de cáncer de pulmón. La atmósfera contiene un gran número de agentes nocivos procedentes de la combustión de combustibles fósiles, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos y metales como el arsénico, el níquel y el cromo (2). Es especialmente preocupante en países desarrollados la contaminación del aire de espacios interiores que se genera del resultado de la

combustión de combustibles sólidos, fósiles o de biomasa, cuyo uso se destina a cocinas y calefacciones (13).

### **Factores de riesgo clínicos**

La presencia de una **historia familiar de cáncer de pulmón** está sólidamente asociada con un incremento del riesgo de cáncer de pulmón (14). **Las enfermedades adquiridas pulmonares** como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se han asociado con un riesgo 2.8 veces superior de cáncer de pulmón (15). Otras enfermedades como el asma (16), la fibrosis pulmonar idiopática (17, 18) o la enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerosis sistémica (19, 20) también se han relacionado con riesgo incrementado de cáncer de pulmón. También los pacientes con **infección por HIV** presentan un riesgo de cáncer de pulmón 2.5 veces superior a la población sin infección por HIV (21).

#### **1.1.2. Patología y bases moleculares**

EL cáncer de pulmón se origina como consecuencia de cambios neoplásicos en las células epiteliales del pulmón. Se desconoce si todas las células epiteliales o sólo un grupo de ellas son susceptibles de una transformación maligna. De hecho, una de las cuestiones más debatidas es discernir si estos cambios sólo tienen lugar en el grupo de células epiteliales con propiedades de células madre (*stem cells*).

El cáncer de pulmón es clínica, biológica, histológica y molecularmente una enfermedad heterogénea. Esta heterogeneidad y complejidad molecular hace difícil discernir la patogénesis del cáncer de pulmón. Tradicionalmente se ha dividido en dos grandes tipos en función de los diferentes patrones de enfermedad y estrategias de tratamiento: el cáncer de pulmón de células no

pequeñas o no microcítico (CPNM) y el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM) (22).

**El cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPNM)** representa un 85% de todos los diagnósticos de cáncer de pulmón e integra 3 subtipos histológicos que por orden de frecuencia son el adenocarcinoma (ADC) (40-60%), el carcinoma epidermoide o de células escamosas (CCS) (25-30%) y el carcinoma de células grandes (CCG) (10-15%) (23). Recientemente, la nueva clasificación genómica del cáncer de pulmón ha eliminado este último subtipo y, en función de la expresión molecular, lo reubica bajo el término de adenocarcinoma o de tumor neuroendocrino (24).

El cáncer de pulmón es una enfermedad compleja que se origina por la interacción de múltiples oncogenes, genes supresores, vías de señalización diversas y factores medioambientales. En la era de la medicina personalizada existe una necesidad creciente de conocer los mecanismos que son responsables de la génesis del cáncer de pulmón con el objetivo de identificar fármacos frente a dianas específicas y establecer biomarcadores sensibles y específicos útiles en los procesos de diagnóstico precoz y en el tratamiento. En los últimos años hemos adquirido conocimientos sobre las alteraciones moleculares de los distintos subtipos de CPNM

*Las alteraciones moleculares en el adenocarcinoma (ADC)* han sido identificadas gracias a la secuenciación del genoma y el exoma y se han descrito una gran cantidad de genes relacionados con este subtipo histológico que incluyen las mutaciones activadoras en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutaciones en KRAS, activación de BRAF, SKT11 (25), mutaciones HER-2 (26) y activación de PI3KCA (27). Otras de las alteraciones moleculares estudiadas en el ADC de pulmón han sido la presencia de genes de fusión que implican la

unión de dominios tirosín-kinasa (TK) y dominios de dimerización. En un análisis de secuenciación de más de 200 muestras de cáncer de pulmón se identificaron 8 genes de fusión (EML4-ALK, KIF5B-RET, CD74-ROS1, SLC34A2-ROS1, CDC6-ROS1, FGFR2-CIT, AXL-MBIP y SCAF11-PDFGRA)(28, 29). La identificación de las mutaciones activadoras en EGFR y del reordenamiento ALK, ha supuesto un cambio en el paradigma del diagnóstico y tratamiento del ADC de pulmón. En estos dos grupos de pacientes, varios ensayos aleatorizados han demostrado la superioridad del tratamiento con inhibidores TK de EGFR e inhibidores de ALK frente al tratamiento convencional con quimioterapia (30-37).

*Las alteraciones moleculares en el carcinoma de células escamosas (CCS)* también se han identificado mediante estudios dirigidos a la secuenciación del exoma y al análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y han identificado 7 genes enriquecidos en mutaciones en el CCS: RB1, TP53, NFE212, KEAP1, PTEN, PIK3CA y MLL2 (38). También se han descrito mutaciones en el gen DDR2 (39) y, por descontado, mutaciones en p53 e inactivación del gen supresor de la proteína CDKN2A(40). La identificación de regulación a la baja de SOCS6 y de otros miembros de la familia de genes SOCS en pacientes con CCS con alta tasa de recaída, suscita la hipótesis de una hiperactivación de la vía de señalización insulina-KIT y de sus receptores. Todo ello, ha dado lugar a ensayos con fármacos inhibidores de estos receptores (41-43). En la actualidad no disponemos de fármacos eficaces frente a dianas específicas en pacientes con CCS. Se están llevando a cabo ensayos con fármacos frente la sobreexpresión de EGFR, la amplificación del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos 1 (FGFR1), y la sobreexpresión de EGFR, MET y PI3K, aunque no se dispone todavía de resultados (40, 44, 45).

**El cáncer de pulmón microcítico o de células pequeñas (CPM)** representa un 15% de todos los cánceres de pulmón. Incluye dos subtipos: una variedad denominada

carcinoma microcítico puro y otra variedad combinada que presenta elementos correspondientes tanto a tumores microcíticos como no microcíticos. El CPM se caracteriza por ser un tumor de rápido crecimiento y proliferación aunque exhibe una mayor sensibilidad a la quimioterapia y a la radioterapia que el CPNM.

*Las alteraciones moleculares en el CPM* han sido descritas en dos proyectos de secuenciación del genoma a gran escala en CPM (46, 47). Ambos estudios han identificado una elevada prevalencia de mutaciones en TP53 y RB1, corroborando los hallazgos de análisis previos. Se detectó amplificación de MYC en un 16% de los casos (46). Uno de estos proyectos de secuenciación identificó mutaciones en varios miembros de la familia SOX, así como amplificación de SOX2 (47). También se ha constatado activación de la telomerasa y sobreexpresión de c-Kit (48, 49). Hasta la fecha no ha sido posible disponer de tratamientos eficaces frente a dianas específicas en el CPM.

### **1.1.3. Presentación clínica y factores pronósticos**

La mayoría de los pacientes presentan una enfermedad sintomática en el momento del diagnóstico. Un 75% de los pacientes con CPM y entre un 50-60% de pacientes con CPNM debutarán con una enfermedad metastásica (50). Ya se ha mencionado que la supervivencia global del cáncer de pulmón a los 5 años no supera el 15%, sin embargo, cuando se diagnostica en estadios iniciales como el IA, la supervivencia a los 5 años puede superar el 80%. Por el contrario, la supervivencia es extremadamente desfavorable para los estadios IIIA, IIIB y IV (13%, 7% y 1% respectivamente a los 5 años) (51). Los factores pronósticos son esenciales en el manejo de los pacientes con cáncer de pulmón. Es sobradamente conocido que la supervivencia está intensamente relacionada con el performance status o estado general y con el estadio de la enfermedad al diagnóstico (52). Es un dato constatado en la literatura, que la comparación de las curvas de supervivencia para cada estadio clínico revela un comportamiento más agresivo y

más rápidamente progresivo en los estadios más avanzados (22). La mayoría de los pacientes diagnosticados de un cáncer de pulmón serán tratados con combinaciones de quimioterapia que incluyen el cisplatino y la respuesta estará relacionada con el tipo de tumor y con las características clínicas, tales como el estadio, el performance status, el tipo de fármaco y la sensibilidad del paciente y del tumor (53).

#### **1.1.4. Principios básicos del tratamiento**

##### **Cáncer de pulmón no microcítico:**

El tratamiento de los estadios iniciales (I-II), si las condiciones del paciente son óptimas, es la cirugía. Para los pacientes con estadios I en los que esté contraindicada una lobectomía o una segmentectomía, se recomienda la radioterapia esteroatáxica o la resección en cuña. La quimioterapia adyuvante con esquemas con platino se recomienda tras la cirugía en los estadios II. No se ha demostrado la eficacia de la quimioterapia tras la cirugía en los estadios I y es objeto de debate la administración de quimioterapia postoperatoria en pacientes con estadios I y tamaño tumoral superior a 4 cm (54).

EL tratamiento de los estadios III incluye la combinación de quimioterapia, radioterapia y cirugía. En pacientes con adenopatías mediastínicas y un estado general o ECOG entre 0 y 1 el tratamiento incluye la quimioterapia con un doblete de platino, administrada de forma concomitante con radioterapia locoregional. El tratamiento para pacientes con comorbilidades o ECOG 2 contempla también la quimioterapia y la radioterapia pero administradas de forma secuencial. La cirugía en este estadio no está indicada como tratamiento único o de primera línea y, aunque es debatible su papel, puede recomendarse dentro de la estrategia

multimodal tras quimioterapia o quimiorradioterapia, en aquellos pacientes en que pueda conseguirse una resección completa mediante una lobectomía (55).

El tratamiento de los estadios IV ha cambiado en los últimos años y se han modificado algunos de los paradigmas del tratamiento de la enfermedad avanzada. Aunque el tratamiento con quimioterapia basada en dobletes de platino sigue siendo la base de la estrategia terapéutica del CPNM en estadio IV, en la actualidad, la histología constituye un pilar básico en la selección del doblete de platino. En la histología de adenocarcinoma la incorporación de la combinación de platino con pemetrexed seguida de un tratamiento de mantenimiento con pemetrexed, constituye una de las opciones de elección como primera línea de la enfermedad avanzada. De igual manera, el triplete que incluye la combinación de paclitaxel, carboplatino y bevacizumab, seguida de un mantenimiento con bevacizumab, es otra de las estrategias de elección en el tratamiento de primera línea de los tumores con histología no escamosa. La identificación de las mutaciones activadoras en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del reordenamiento en el gen de la kinasa del linfoma anaplásico (ALK), han producido un cambio en el tratamiento del ADC de pulmón. En estos dos grupos de pacientes, varios ensayos aleatorizados han demostrado la superioridad del tratamiento con inhibidores de la tirosina-quinasa de EGFR (TKI-EGFR) e inhibidores de ALK frente al tratamiento convencional con quimioterapia (56). La población de nuestro estudio se sitúa en un periodo anterior a la introducción de todos estos cambios y en la mayoría de los pacientes con CPNM en estadio IV se utilizaron combinaciones de platino cuyo criterio de selección no fue la histología.

### **Cáncer de pulmón microcítico:**

El cáncer de pulmón microcítico (CPM) se suele diagnosticar en estadios avanzados o localmente avanzado. El tratamiento de elección es la quimioterapia

con el esquema que combina Cisplatino y etopósido. En los estadios localizados el tratamiento incluye la quimioterapia con este esquema y la administración concomitante de radioterapia locorregional. En los pacientes que alcanzan una respuesta parcial o completa con el tratamiento, está indicada la administración de radioterapia holocraneal profiláctica (57).

## **1.2. Estrés oxidativo**

### **1.2.1. Concepto de estrés oxidativo y radicales Libres**

Estrés oxidativo (EO) es un término ampliamente utilizado que hace referencia a un desequilibrio entre la generación de especies prooxidantes y la eliminación de las mismas mediante sistemas antioxidantes. Dicho equilibrio se encuentra desplazado hacia la generación de especies prooxidantes, bien por el aumento de la producción de estas especies o por la disminución en los efectos protectores de los sistemas antioxidantes. Cada una de las células del cuerpo humano mantiene una condición de homeostasis entre los elementos oxidantes y antioxidantes. Ambos tipos de elementos son imprescindibles para el metabolismo, la transducción de señales y la regulación de las funciones celulares (58).

Definimos como radical libre a aquella especie química que tiene uno o más electrones desapareados en su última capa. Esta característica le proporciona una gran capacidad de reaccionar con la mayoría de las biomoléculas (59).

En la figura 2 se ilustra el proceso de la formación y detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (EROs) en las células eucariotas.

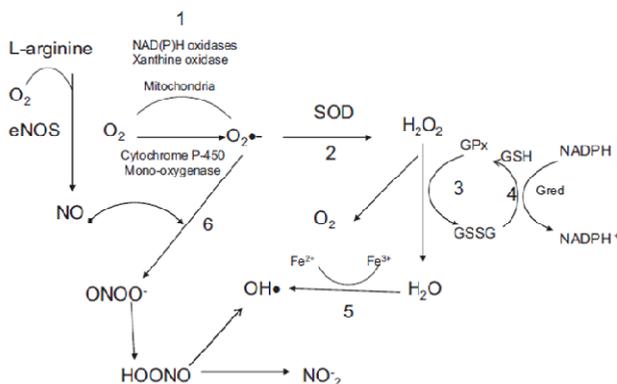


Figura 2: Formación y detoxificación de la EROs

-Reacción 1: El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forma por un proceso de reducción del oxígeno molecular mediado por los sistemas enzimáticos Nicotinamida Adenina Dinucleótico Fosfatos Oxidasa (NAD(P)H oxidasas), xantina oxidasa, etc. -Reacción 2: El radical superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). -Reacción 3: El peróxido de hidrógeno es eliminado por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) que requiere el glutatión (GSH) como donante de electrones. -Reacción 4: El glutatión oxidado (GSSG) vuelve a reducirse a GSH a través de la enzima glutatión reductasa (Gred) que utiliza el sistema NADPH como donante de electrones. -Reacción 5: algunos metales, como por ejemplo  $Fe^{2+}$  pueden transformar el peróxido de hidrógeno en el radical hidroxilo (HO•)(Reacción de Fenton). -Reacción 6: El radical superóxido se puede combinar con el óxido nítrico (NO) para producir peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ).

En los apartados siguientes, se detallará cada enzima implicada tanto en la producción como en la protección frente al EO.

## Tipos de Especies Reactivas

**Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):** Es el radical más abundante a pH fisiológico. En el metabolismo aerobio el 1-2% del consumo total de oxígeno da lugar a la formación de anión superóxido. Es inestable y puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios, a su vez muy reactivos. Tiene una vida media de

algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, donde a partir de dos radicales superóxido se produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno (60).

Se forma como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, entre otras, o en la cadena respiratoria mitocondrial (59).

*Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ):* No es un radical libre, pero su toxicidad es importante. Atraviesa con facilidad las membranas celulares. Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Muchas enzimas producen  $H_2O_2$  a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, etc. (60). La enzima catalasa es la encargada de eliminar esta especie reactiva, liberando agua en el proceso (59).

Además, el  $H_2O_2$  está implicado en la regulación de la transducción de señales y expresión de diversos genes a través de los factores de transcripción, NFkB1 y AP-1. Ambos factores de transcripción son capaces de inducir la transcripción de genes tales como la interleucina 2, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos (61-63).

*Radical hidroxilo (HO):* Es la especie química más reactiva que se conoce y por tanto, más tóxica. Tiene un vida media estimada de alrededor  $10^{-9}$  segundos(64). Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ) que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el peróxido de oxígeno en dos moléculas de radical hidroxilo.

*Óxido nítrico (NO):* El óxido nítrico tiene una gran importancia por su función fisiológica, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su

condición de radical libre. Juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos que incluyen la regulación de la presión arterial, la neurotransmisión y los mecanismos de defensa (65). El óxido nítrico tiene una vida media corta en entornos acuosos. Se produce en varios tipos celulares mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La superproducción de especies reactivas del nitrógeno se denomina estrés nitrosativo e induce efectos citotóxicos y mutagénicos. El estrés nitrosativo puede dar lugar a reacciones de nitrosilación que pueden alterar la estructura de la proteína e inhibir sus funciones normales (59).

*Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)*: No es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (66). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, degradar carbohidratos y fragmentar el ADN, por lo que es un importante mediador del proceso aterogénico (67, 68).

### **Efectos de los Radicales Libres**

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la proximidad donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres; pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

La oxidación se produce en las cuatro biomoléculas principales: lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los radicales libres pueden reaccionar con estas

biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de su función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc.

#### *Daño oxidativo a proteínas:*

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (69). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (70). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a desnaturalización de la proteína. Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (69).

#### *Daño oxidativo a los lípidos:*

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (71), provocando su peroxidación. El resultado de esta peroxidación es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. El proceso de peroxidación lipídica comienza cuando un radical libre oxida a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno y se forma un radical alquílico (72). Este radical reacciona con el  $O_2$  y forma un radical peróxido. Los radicales peróxido pueden reaccionar con las cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (73). De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos (73). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares y causan

mutaciones en el DNA, así como daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (72). La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de las células aeróbicas (74).

#### *Daño oxidativo a los glúcidos:*

Los radicales libres atacan a los glúcidos de distintas formas. Los monos y disacáridos resisten a la acción de las EROs. La glucosa constituye un captador del radical superóxido al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son capaces de eliminar el radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (75). Sin embargo, los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres. Esta acción provoca la pérdida de la función estructural de los mismos y da lugar a procesos degenerativos (76).

#### *Daño oxidativo al ADN:*

Los ácidos nucleicos también son susceptibles de sufrir los efectos del estrés oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas del ADN y formar el radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos. El número de bases diferentes modificadas encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo supera la veintena. La alteración más frecuente que se observa es la oxidación de la base guanósina, produciendo 8-hidroxi-2'-deoxiguanósina. Su importancia reside en su poder mutagénico, ya que durante la replicación, producirá transversiones del nucleótido timina por citosina (77). En consecuencia, cuando tiene lugar la replicación del ADN dañado o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, se origina una mutación (78, 79). Por ello las lesiones oxidativas del ADN parecen estar implicadas en el envejecimiento

celular, en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada y en el cáncer.

*Daño oxidativo en el citosol:*

El glutatión es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células. El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí para dar lugar a la forma oxidada (GSSG). Por ello, un indicador del estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumento del cociente GSSG/GSH y disminución del glutatión total (80).

### **1.2.2. Sistemas protectores y productores de estrés oxidativo**

#### **Sistemas protectores frente al estrés oxidativo**

Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos antioxidantes diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres. En este estudio no abordaremos el análisis de los sistemas protectores, pero nos parece adecuado mencionar brevemente las características de estos sistemas. Estos pueden clasificarse en 3 grandes grupos:

1. Sistemas de defensa enzimáticos: se trata de un mecanismo intracelular que elimina las EROs una vez formadas y repara sus defectos.
2. Sistemas captadores de EROs: enlentecen considerablemente las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las EROs

transformándolas en otras sustancias menos agresivas y recuperan proteínas oxidadas previamente.

3. Quelantes de metales de transición: son moléculas que captan el hierro (ferritina y transferrina) y el cobre (ceruloplasmina) e impiden que estos metales actúen como catalizadores de las reacciones de Fenton.

### Sistemas de defensas enzimáticas

*Superóxido Dismutasa (SOD)*: La superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa. Cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno que, a su vez, puede ser destruido por las actividades de la catalasa o de la glutatión peroxidasa (81).

*Catalasa (CAT)*: Es una enzima tetramérica. Constituye una de las enzimas más eficaces, tanto que no puede ser saturada por  $H_2O_2$  a ninguna concentración y cataliza su conversión a  $H_2O$  y  $O_2$ , para proteger a las células del  $H_2O_2$  que se genera en su interior.

*8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1)*: Es una enzima reparadora del ADN. La OGG1 es la enzima responsable de la escisión de 8-oxo-dG, la base mutagénica más abundante derivada del ataque oxidativo al ADN y considerada como el biomarcador del daño oxidativo en el ADN (82).

### Sistemas captadores de especies reactivas

*Sistema Glutatión*: El glutatión (GSH) representa el principal antioxidante intracelular de bajo peso molecular responsable del estado redox. Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. El GSH se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-

reducción: como glutatión reducido (GSH) o como glutatión oxidado (GSSG). Gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína, el cual promueve su estabilidad intracelular. El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas. Una de ellas es la de proteger a la célula frente a los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa (83).

*Sistema Tiorredoxina:* El sistema tiorredoxina está constituido por dos tiorredoxinas (TRX) y varias tiorredoxina reductasas (TRXR) que se encuentran en diferentes localizaciones celulares y subcelulares. Este sistema participa en una amplia gama de funciones dentro de la célula, incluidas la protección contra el EO, la síntesis de precursores de ADN, la regulación de la proliferación celular y diferenciación, el control de la apoptosis, la modulación del sistema inmunológico, el control redox de la actividad de los factores de transcripción y la promoción del desarrollo del cáncer (84-86).

### **Sistemas productores de estrés oxidativo**

Los radicales libres se forman en numerosos procesos celulares, tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidoreductasa) y en el metabolismo de xenobióticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente.

Los radicales libres, aparte de las fuentes endógenas descritas anteriormente, pueden también proceder de fuentes externas. Con la dieta se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante, y también constituyen una fuente de EROs el humo de tabaco, la polución ambiental, el ozono, etc. (87, 88).

Pese a que los radicales libres provienen de fuentes exógenas y endógenas, en este estudio sólo nos centraremos en las fuentes endógenas y concretamente en las producidas por: la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, la xantina oxidorreductasa y la óxido nítrico sintasa.

#### *Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NAD(P)H oxidasa)*

La enzima NAD(P)H oxidasa (NOX) presente en la membrana plasmática de distintos tipos celulares, entre ellos en las células fagocíticas donde se caracterizó por primera vez, es una importante fuente biológica de producción de EROs. La familia de proteínas NOX produce EROs mediante un proceso enzimático NAPH-dependiente, en el que la reducción de un o dos electrones de oxígeno, da lugar al radical superóxido ( $O_2^-$ ) o al radical peróxido de oxígeno ( $H_2O_2$ ) a través de las membranas biológicas (89).

En mamíferos se han descrito 7 isoformas de NOX con capacidad para generar ROS: la producción ( $H_2O_2$ ) es exclusiva de NOX4 y de las oxidasas duales (DUOX-1 y 2). El resto de subunidades de la familia (NOX1-3 y NOX5) producen radical superóxido (90, 91). Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a las próximas.

La primera identificación de una proteína de la familia NOX fue consecuencia del descubrimiento de que una mutación en el complejo gp91<sup>phox</sup> (renombrado como NOX2) era la responsable de un *Síndrome ligado a X*, caracterizado por la

incapacidad de los leucocitos para destruir bacterias y hongos en pacientes jóvenes. Las mutaciones en el complejo NOX2 producen una disminución de la producción de ROS por los leucocitos y constituyen la causa subyacente de la enfermedad granulomatosa crónica en la que los fagocitos fracasan en la destrucción de los agentes patógenos que han sido fagocitados (92-94). La actividad de NOX2 está ligada a la interacción específica con una serie de proteínas; la función oxidasa depende de la unión a la proteína de membrana  $p22^{phox}$  que permitirá el anclaje de NOX2 a la membrana plasmática. Resulta esencial para la regulación de la actividad oxidasa de NOX2 el reclutamiento de diversas proteínas citosólicas que incluyen  $p47^{phox}$  (Factor Citosólico 1 de Neutrófilos-NCF1),  $p40^{phox}$  (Factor Citosólico 4 de Neutrófilos-NCF4),  $p67^{phox}$  (Factor Citosólico 2 de Neutrófilos-NCF2) y la proteína Rac (Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate) (95).

Inicialmente, se consideró que el sistema NOX estaba sólo presente en los fagocitos para proteger al huésped frente a los organismos patógenos. Hoy sabemos que las células no-fagocíticas también expresan subunidades de NOX, aunque la expresión de cada tipo de subunidad está restringida por el tipo de tejido y el contexto celular (96, 97).

NOX1 se expresa en el epitelio del colon, tanto maligno como normal, y se ha identificado en bajos niveles en el músculo liso del sistema vascular y en otros tejidos normales (98). NOX3 se expresa en las células epiteliales sensoriales de la cóclea y el vestíbulo del oído interno y se ha relacionado con la génesis del sistema de otolitos y con la percepción de la gravedad y el equilibrio (99, 100). NOX4 se expresa en las células del túbulo distal de la corteza renal y en las células endoteliales. También se han demostrado niveles bajos de expresión en los adipocitos, el músculo esquelético, los cardiomiocitos, el cerebro y el epitelio de las vías aéreas. Se ha detectado, asimismo, expresión de NOX4 en tumores de

ovario, riñón, cerebro y melanoma maligno (95, 101-103). NOX5 se expresa fundamentalmente en los espermatozoides, el músculo liso uterino y en las áreas ricas en linfocitos del bazo y los ganglios linfáticos que contienen linfocitos B maduros y linfocitos T respectivamente. Su expresión se ha objetivado también en el ovario, la placenta y los fibroblastos cardiacos. Se han constatado niveles elevados de NOX 5 en algunos tumores y líneas celulares de cáncer de mama, en esófago de Barret, en algunos tipos de leucemia, en cáncer de próstata y en melanoma (95, 98, 104-107). DUOX1 es patente en las células epiteliales de las vías aéreas donde, de forma relevante, se encuentra implicada en la defensa del huésped (108), y en el tiroides donde DUOX1 genera  $H_2O_2$ , que es esencial para la síntesis de hormonas tiroideas (109). En general, la expresión de DUOX1 en tumores humanos es uniformemente baja (98). DUOX2 se describió inicialmente como una enzima productora de  $H_2O_2$  en el tiroides y tiene un papel esencial en la síntesis de hormonas tiroideas (110). Aunque no hay muchos estudios que evalúen sus niveles de expresión en tumores, se ha evaluado su expresión en tumores de pulmón, tiroides, colon y páncreas (95, 111-113).

### *Xantina Oxidorreductasa*

La xantina oxidorreductasa (XOR), también conocida como xantina deshidrogenasa (XDH) es una enzima muy versátil que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (desde las bacterias hasta el hombre). Cataliza la oxidación de muchos sustratos, bien sean endógenos como las purinas o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico. Este es el producto final del catabolismo de las bases púricas en algunos primates y en el hombre (114). La XDH es una de las dos formas de XOR; la otra es la xantina oxidasa (XO), la cual deriva de la XDH a través de cambios post-traslacionales (114). En humanos, la XO se presenta normalmente como XDH y completa su vía metabólica mediante el uso

de  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones. Bajo condiciones patológicas, como la isquemia y la inflamación, la XDH se convierte en XO y utiliza el oxígeno como un aceptor de electrones (115). Cuando se libera la XO de los tejidos dañados, puede proseguir dañando el epitelio, el endotelio vascular y otras áreas cercanas (116). El nivel de actividad de la XO aumenta bajo condiciones patológicas cuando lo comparamos con individuos sanos normales (115). La oxidación de hipoxantina/xantina y la reducción de nitrato/nitrito por la XOR conduce a la producción de EROs (114), situación que, como venimos documentado, se halla implicada en más de 150 situaciones patológicas en el ser humano (73).

### *Óxido Nítrico Sintasa*

Previamente hemos definido el óxido nítrico (NO) como un radical libre que se encuentra implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen la vasodilatación, la neurotransmisión, la inmunidad y la carcinogénesis. El NO está compuesto por átomos de nitrógeno y oxígeno que se unen covalentemente para formar una molécula diatómica. El NO es un gas soluble en agua y lípidos, que contiene un electrón desapareado, lo que lo convierte en una molécula altamente reactiva que participa en multitud de reacciones químicas. En general, el NO es un radical libre relativamente estable que difunde con facilidad desde el lugar de producción, a través de las membranas celular e interacciona con dianas sin la necesidad de transportadores o receptores específicos (117, 118).

El NO se sintetiza a partir la L-arginina en una reacción catalizada por la familia de enzimas intracelulares denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), en presencia de oxígeno y de la forma reducida de NADPH. La enzima NOS existe en forma de 3 isoformas: NOS neuronal (nNOS/NOS1), NOS inducible (iNOS/NOS2) y NOS endotelial (eNOS/NOS3) (119). Las isoformas nNOS y eNOS están

constitutivamente expresadas en distintos tipos celulares que incluyen el endotelio, las plaquetas y las neuronas (120). Sin embargo, iNOS no se expresa en células en reposo, pero posee la capacidad de expresarse rápidamente como respuesta a estímulos pro-inflamatorios como citoquinas o el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) (121).

### **1.3. Estrés oxidativo y cáncer de pulmón**

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que como ya hemos visto anteriormente, puede afectar a diversas moléculas y puede reflejarse en la alteración de sus funciones fisiológicas (122, 123). El EO se ha descrito en muchas condiciones patológicas y se le atribuye un papel en el inicio, la promoción y la progresión del proceso de carcinogénesis (124).

Los pulmones, debido a su relación con el medioambiente, son órganos susceptibles de sufrir daños por oxidantes exógenos como la contaminación del entorno y por EROs endógenas generadas por células inflamatorias. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los oxidantes ejercen sus efectos nocivos sobre los pulmones siguen siendo objeto de debate (125). El humo del tabaco representa la causa fundamental del cáncer de pulmón aunque variables genéticas puedan influir sobre el riesgo individual. El humo del tabaco induce una inflamación crónica en la vía aérea con acumulación y activación de leucocitos que producen concentraciones elevadas de EROs y NO. El daño ejercido por el NO es consecuencia de su reacción con las EROs, de la modificación de la función de las proteínas por procesos de nitración o por inducir daños en el ADN. Los pacientes

con cáncer de pulmón presentan niveles elevados en suero de proteínas nitradas lo que sustenta la presencia de EO y estrés nitrosativo (126). Los estudios de inmunohistoquímica en tumores de pulmón demuestran una mayor expresión de proteínas nitradas en el tumor con respecto a los tejidos no tumorales (124). Los niveles de NO determinarán sus efectos biológicos que incluyen la angiogénesis, eritropoyesis y glicolisis (127). En presencia de niveles bajos de NO se producirá activación del factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ); sin embargo, niveles elevados de NO producirán inactivación del gen p53 (128). Un 90% de los tumores de pulmón presentan alteraciones en p53, pero la inactivación de p53 por procesos de nitración podría también contribuir a la carcinogénesis. La nitración de otras proteínas como hnRNPk o la anexina III asociadas al cáncer de pulmón, dará lugar a un incremento de la proliferación celular y del crecimiento incontrolado (129, 130). Por tanto, el NO tiene diversos efectos sobre la angiogénesis, la glicolisis, la actividad de p53 y las vías de crecimiento celular, y esto permitirá que se genere un microambiente que puede iniciar la tumorogénesis y promover la heterogeneidad y las metástasis.

La exposición prolongada al tabaco también da lugar a una disminución de la concentración de numerosos antioxidantes (131).

Además del tabaco, como ya hemos expuesto, existe una gran variedad de tóxicos como el asbesto, los hidrocarburos policíclicos aromáticos, el arsénico y las emisiones de diesel, que han sido identificados como causas potenciales del cáncer de pulmón (132). Algunos de estos carcinógenos reaccionan covalentemente con el ADN para producir daño oxidativo y producen roturas en el ADN (132). Estos carcinógenos también pueden producir respuestas patológicas en el pulmón mediante la activación de vías de señalización. De hecho, los contaminantes del aire y las EROs pueden activar la vía de señalización MAPK que

finalmente producirá inflamación (59). El EO no sólo interviene en el proceso de carcinogénesis.

Se ha relacionado también el nivel de EO con el pronóstico y el tratamiento. Algunos estudios sugieren que los estadios avanzados de cáncer de pulmón exhiben un nivel de EO más elevado que los estadios iniciales y esto contribuiría a explicar la baja supervivencia en la enfermedad avanzada (133, 134). En esta línea, algunos trabajos muestran que la expresión en el tumor de niveles elevados de enzimas como la XDH, relacionadas con la producción de radicales libres se asocia a una peor supervivencia (115). Otros estudios no han sido capaces de corroborar este hallazgo (135). Existe también una evidencia creciente que sugiere que la producción de EROs por las distintas subunidades de la familia NOX está relacionada con la proliferación y con la capacidad invasiva de distintos tumores malignos (136, 137). La expresión de NOX puede ser crucial en el desarrollo de un microambiente oxidativo donde la producción de EROs genere señales proangiogénicas que favorezcan la replicación del tumor y las metástasis (95, 138).

Los tratamientos utilizados para el cáncer de pulmón, como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, causan fenómenos inflamatorios locales crónicos y EO. Estos efectos producen consecuencias deletéreas sobre la función cardiopulmonar del paciente, que dependerán de la reserva funcional de cada individuo y de las comorbilidades asociadas (59). En mayor medida que en otro tipo de tumores, este aspecto en particular, puede afectar negativamente al pronóstico y la supervivencia de los pacientes al limitar el uso y la adherencia a tratamientos óptimos administrados con intención curativa.

Uno de los fármacos más activo y más ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón es el cisplatino. El cisplatino genera EROs (139) que pueden

producir daño tisular extenso mediante su interacción con todas las macromoléculas biológicas, como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Esta interacción da lugar a la formación de sustancias oxidadas como el malondialdehído (MDA) que es el producto de la peroxidación de la membrana lipídica (140-142). Las combinaciones de quimioterapia con cisplatino inducen una disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes que pueden ser consecuencia de un fracaso de los mecanismos de defensa antioxidantes o de un consumo de los mismos frente al daño oxidativo (143). Varios estudios muestran niveles elevados de MDA en pacientes con cáncer de pulmón y confirman un aumento de la peroxidación lipídica en estadios avanzados (133, 144). Tras la quimioterapia también se observa aumento de los niveles de nitritos y disminución de los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión (GSH) (133).

#### **1.4. Importancia del estudio de las variables genéticas del paciente con cáncer de pulmón: impacto en el riesgo, el pronóstico y la eficacia de los tratamientos.**

Es frecuente observar una gran variabilidad entre individuos, tanto en la susceptibilidad para desarrollar un cáncer de pulmón como en la supervivencia y en la tasa de respuesta al tratamiento antitumoral. Estas diferencias se explican por numerosos factores relacionados con el paciente y con el tumor. Estos factores, como ya hemos mencionado al inicio de esta introducción, incluyen aspectos tan diversos como el estadio tumoral, la raza, la edad, el género, los hábitos tóxicos, la función renal o hepática, o las medicaciones concomitantes. En numerosos casos, los factores genéticos han demostrado ser responsables en un

20-95% de la variabilidad en el riesgo, el pronóstico y la respuesta a los tratamientos (145).

Existen diversas estrategias de aproximación al estudio de las variables genéticas de los individuos. Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano ha sido la caracterización e identificación de millones de loci polimórficos distribuidos a lo largo de los 3250 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma.

Un polimorfismo se define como una variante genética que aparece al menos en el 1% de los cromosomas de la población. Estas variables pueden estar localizadas en cualquier región de un gen o en regiones intergénicas. Las variantes localizadas en un gen pueden inducir cambios en la proteína o en el patrón de expresión del gen. Así, variaciones en la región 5' no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) puede alterar los niveles de expresión, mientras que cambios en 3'UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm. Cuando las variaciones se localizan en un exón pueden generar una alteración en la secuencia del codón de forma que, éste siga codificando el mismo aminoácido, *cambio sinónimo*, o que el codón pase a codificar un aminoácido diferente, *cambio no sinónimo*, o un aminoácido terminador, una parada en la secuencia, o un cambio en la pauta de lectura de la secuencia. Todos estos polimorfismos, excepto el cambio sinónimo, producirían una secuencia proteica alterada y como consecuencia, un mayor o menor grado de alteración de su función biológica.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) se encuentran distribuidos en el genoma con una frecuencia media estimada de un SNP por cada 250-300 nucleótidos. Se calcula que existen 11,5 millones de SNPs distribuidos a lo largo del genoma humano, lo que corresponde aproximadamente a un 0,35% del total de nucleótidos.

La singularidad genética del individuo puede determinar su susceptibilidad a padecer un cáncer de pulmón. La historia familiar está sólidamente asociada con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Un meta-análisis de 41 estudios de casos y controles reveló que la existencia de una historia familiar positiva de cáncer de pulmón estaba asociada a un riesgo 1,7 veces mayor de padecer cáncer de pulmón. Los primeros estudios epidemiológicos en sangre sobre variaciones en la línea germinal relacionadas con el riesgo de cáncer de pulmón se iniciaron mediante el estudio de variantes genéticas (SNPs) en genes candidatos que codificaban enzimas de vías metabólicas específicas. Se realizaron estudios poblacionales que se centraron en las vías del metabolismo de carcinógenos (146), la reparación del DNA (147-149), y la inflamación (150). En general los resultados de estos estudios han sido dispares, y existe poca concordancia entre las distintas poblaciones analizadas y las asociaciones con los SNPs de los genes seleccionados. Recientemente, se han llevado a cabo estudios de asociación del genoma completo (GWAS, en inglés *genome-wide association studies*) y el resultado de 4 de estos estudios coincide en la identificación de una región en el brazo largo del cromosoma 15 (15q25-25.1) (151-154). Aquellos individuos que presentaban al menos una variante alélica de un SNP en esta región (rs8034191) en el gen del receptor de la acetilcolina (variante presente en un tercio de la población del estudio) exhibieron un riesgo de desarrollar cáncer de pulmón 1,3 veces superior a la población con el alelo mayor o consenso (152-154).

Las variantes genéticas de un individuo también pueden tener impacto en la supervivencia y en la respuesta a los tratamientos. Una de las vías más estudiada en el cáncer de pulmón ha sido la vía de reparación del ADN. El cisplatino es un fármaco clave en la quimioterapia del cáncer de pulmón. Ejerce su efecto citotóxico mediante la generación de aductos con el ADN, que conducen a la

distorsión grosera del ADN, la desestabilización de la doble hélice, la inhibición de la replicación del ADN, de la transcripción y finalmente a la muerte de la célula tumoral. Teóricamente, la presencia de polimorfismos en los genes de reparación del ADN podría relacionarse con el pronóstico del cáncer de pulmón de dos maneras opuestas. Los polimorfismos que conllevan una reparación deficiente del ADN se asociarían a un comportamiento tumoral más agresivo aunque, por otra parte, estos mismos polimorfismos podrían determinar una respuesta favorable a la quimioterapia con platino mediante una pobre eliminación de los aductos de ADN (155). El estudio de polimorfismos en genes de reparación del DNA (ERCC1, XRCC1, XPG, XPD) y su relación con el pronóstico, con la respuesta y con la toxicidad a los tratamientos han sido analizados en el cáncer de pulmón no microcítico frecuentemente, aunque con resultados discordantes (155-162). También se han realizado análisis de polimorfismos de genes implicados en otras vías metabólicas, como polimorfismos en citidina deaminasa (CDA) y su relación con la respuesta a gemcitabina (163), polimorfismos en el gen de la uridin difosfato-glucuronosiltransferasa 1A (UGT1A) y su relación con la toxicidad a irinotecan (164), polimorfismos en CASP7 (miembro de la familia de las proteínas ácido cisteína-aspartático) (165) o en la proteína G (RGS del inglés *the regulator of G-protein signaling pathway*) (166) y su relación con la supervivencia de pacientes con CPNM. En definitiva, existen numerosos estudios de análisis de polimorfismos en genes implicados en diferentes vías de señalización cuyo objetivo es explicar las diferencias entre individuos en términos de riesgo, pronóstico y respuesta a los tratamientos.

## **1.5. Polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo en el cáncer de pulmón**

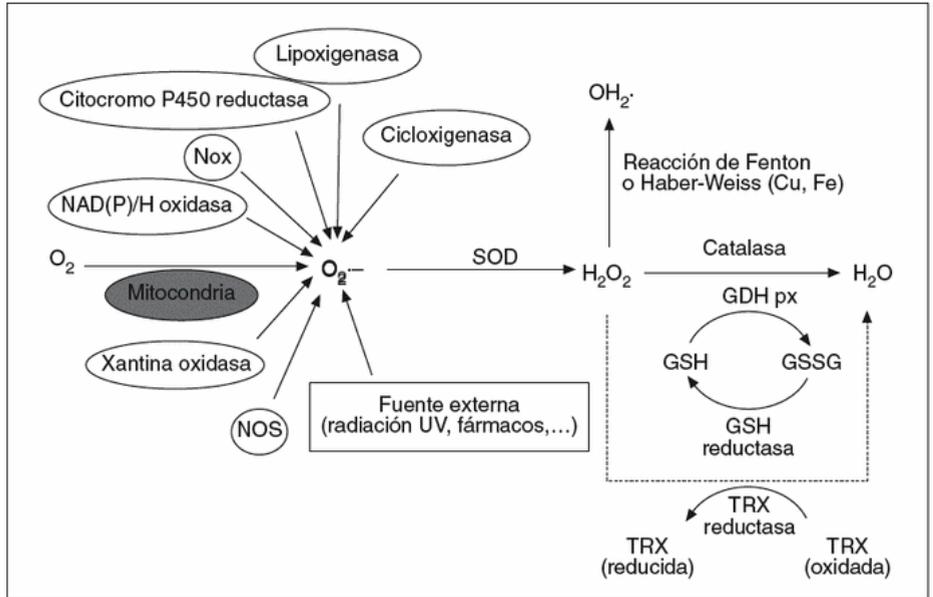
Ha quedado patente por lo anteriormente expuesto que el EO puede intervenir, no sólo en el proceso de carcinogénesis del cáncer de pulmón, sino también en el pronóstico y en los resultados del tratamiento.

Una célula tumoral está sometida a un estrés oxidativo elevado y persistente porque existen niveles elevados de producción intracelular de EROs. En condiciones normales los niveles intracelulares de EROs se mantienen con la ayuda de antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa, catalasas y glutatión peroxidasa, o mediante antioxidantes tiólicos no enzimáticos como glutatión y tiorredoxina (167). En procesos como el cáncer este equilibrio se rompe.

Ya hemos mencionado que los sistemas enzimáticos esenciales en la producción de EROs incluyen la xantina oxidoreductasa XOR, también conocida como xantina deshidrogenasa (XDH), las ciclooxigenasas, las lipooxigenasas, la citocromo P450-oxidasa, las óxido nítrico sintasas (NOS) y las NADPH oxidasas.

La figura 3 representa los sistemas enzimáticos implicados en la producción de EROs.

Figura 3: Sistemas enzimáticos implicados en la producción de EROs



La presencia de alteraciones funcionales o cambios en la expresión de los genes relacionados con el EO puede estar modulada por una variabilidad genética heredada asociada a polimorfismos y es razonable que estas alteraciones estén implicadas en la génesis y evolución del cáncer de pulmón.

No existen muchos trabajos que aborden el análisis conjunto de estos genes relacionados con el EO y lo relacionen con el pronóstico y la respuesta a los tratamientos en el cáncer de pulmón.

Revisaremos a continuación los datos más relevantes acerca de la relación de los polimorfismos en genes relacionados con EO con la susceptibilidad, la respuesta al tratamiento y el pronóstico en cáncer de pulmón.

### **1.5.1. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la susceptibilidad al cáncer de pulmón**

La susceptibilidad de desarrollar un cáncer de pulmón se asocia a una predisposición individual que puede ser consecuencia de la existencia de polimorfismos en genes que codifican para enzimas implicadas en el EO. Numerosos estudios han intentado demostrar esta asociación aunque los resultados han sido dispares.

El sistema enzimático del cromosoma P450 pertenece a la gran superfamilia de genes monooxigenasa. Existen 4 familias de citocromos P450 relacionadas con el metabolismo oxidativo de sustancias xenobióticas en las células de los tejidos pulmonares (CYP1-4). La mayoría de los datos relativos al papel de los polimorfismos en los genes CYP en relación al riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón se han identificado en los citocromos pertenecientes a las familias CYP 1 y 2 (168). Un análisis combinado realizado con 2451 casos de cáncer de pulmón y 3358 controles sanos, mostró una clara asociación entre el genotipo CYP1A1\*2A/\*2A y el riesgo de cáncer de pulmón en población caucásica (169). CYP2A6 ha demostrado ser una enzima clave en el metabolismo oxidativo de la nicotina y se postula que su ausencia podría reducir el riesgo de cáncer de pulmón. De hecho, los individuos homocigotos o heterocigotos para alelos mutados o delecionados de CYP2A6, demostraron un riesgo significativamente inferior de cáncer de pulmón en un estudio japonés (170). Este resultado no se pudo confirmar en población europea (171).

La NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) es una flavoproteína citosólica que se relaciona con el metabolismo de los carcinógenos relacionados con el humo del tabaco. La asociación entre polimorfismos en NQO1 y el riesgo de cáncer de pulmón ha sido evaluada en distintos estudios con resultados heterogéneos. El

efecto de los polimorfismos de NQO1 en la susceptibilidad al cáncer de pulmón se modifica por los hábitos individuales de exposición al tabaco (172).

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosomal que convierte el bezo(a)pireno en un metabolito altamente carcinógeno (bezo(a)pireno 7,8-diol-9,10 epoxido). También activa los carcinógenos derivados del humo del tabaco e induce la formación endógena de radicales libres. Los polimorfismos en el gen de la MPO parecen contribuir a la modulación del riesgo global de cáncer de pulmón, aunque no todos los estudios muestran resultados concordantes (168).

La super-familia de enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) cataliza la detoxificación de un amplio número de sustratos y tiene un papel importante en la fase II de la biotransformación de sustancias xenobióticas. La detoxificación se consigue mediante la conjugación de las sustancias xenobióticas con el glutatión, lo que facilita la neutralización de su centro electrofílico con su grupo -SH. Las sustancias xenobióticas conjugadas son más fáciles de eliminar. La mayoría de los datos sobre polimorfismos en los genes de GST y de su asociación con la susceptibilidad individual para el cáncer de pulmón proceden de la identificación de polimorfismos en la isoforma GSTM1. Su papel en el desarrollo del cáncer de pulmón ha sido demostrado en varios trabajos (173-175). La cantidad de tabaco acumulada tiene impacto sobre el riesgo de cáncer de pulmón asociado a los polimorfismos en GSTs (176).

Las enzimas glutatión peroxidasas (GPx) pertenecen al grupo de las selenoproteínas. Se han descrito 4 formas de GPx. Sólo se han realizado estudios para evaluar el riesgo de cáncer de pulmón en una de las formas de GPx. Se trata de la glutatión peroxidasa citosólica (GPx1, cGPx). GPx1 es una de las enzimas más importantes en la protección frente al EO. Se ha descrito un polimorfismo (Pro198Leu) en el gen que codifica para esta enzima (hGPx1). Los individuos

portadores de al menos uno de los alelos 198Leu, presentan una mayor susceptibilidad al cáncer de pulmón inducido por el EO, ya que en estos individuos se ha objetivado niveles elevados del radical libre 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (177).

### **1.5.2. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la respuesta al tratamiento en cáncer de pulmón**

El aumento de la capacidad antioxidante es un mecanismo que está implicado en la resistencia a los tratamientos frente al cáncer (178, 179). Existen pocos trabajos dirigidos a estudiar la influencia de polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo en la respuesta a los tratamientos en el cáncer de pulmón.

En el ámbito del cáncer, el NO puede tener un efecto dual, citoprotector o citotóxico en función de su concentración (180). La sobreexpresión de NOS2 aumenta la respuesta a la radioterapia en el cáncer colorrectal a través de la activación de la vía p53 y de mecanismos apoptóticos dependientes de caspasa (181). Por otra parte, los radicales NO pueden contribuir a inducir resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia (182). En los pacientes con cáncer de pulmón se producen diversas citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , etc.) que aumentan la producción de NO (183). Todos estos datos sugieren que NO y NOS pueden ser objeto de estrategias de tratamiento en el cáncer de pulmón. Pocos estudios han evaluado la asociación entre variantes genéticas en genes de NOS y la respuesta al tratamiento. Recientemente se han publicado los datos de un trabajo que investigó la asociación entre 35 SNPs en los genes NOS2A y NOS3 y la respuesta al tratamiento con quimio-radioterapia en una cohorte de 198 pacientes con CPNM. El estudio no reveló ninguna asociación de estos polimorfismos con la respuesta al tratamiento (184). Un polimorfismo consistente en un número variable de

repeticiones en tándem en el intrón 4 (VNTR) del gen eNOS tampoco se asoció a la respuesta a quimioterapia en 82 pacientes con CPNM en estadios III-IV (185).

La enzima glutatión-S transferasa, en concreto la isoenzima GSTP1, está sobreexpresada en el cáncer de pulmón (186) y puede tener influencia en la respuesta a la quimioterapia con esquemas que contengan platino (187). En una cohorte de 115 pacientes con CPNM avanzado tratados con esquema de quimioterapia basados en platino, la presencia de rs1695, SNP en GSTP1, se asoció a una mejor respuesta y pronóstico (188).

Aunque la presencia de mutaciones activadoras en el dominio tirosina quinasa de EGFR constituyen el factor predictivo más sólido de respuesta al tratamiento con los inhibidores de la de la tirosina quinasa de EGFR (TKI-EGFR), se han descrito variantes genéticas que pueden influir en la eficacia de estos fármacos (189-191). Se ha descrito que las especies reactivas del oxígeno (EROs) pueden estar implicadas en la resistencia a los inhibidores TKI-EGFR al conseguir mantener fosforilado el dominio tirosina quinasa de EGFR (192). Un trabajo publicado en el último año examina el efecto de 20 SNPs en genes relacionados con el estrés oxidativo en 219 pacientes tratados con inhibidores TKI-EGFR y concluye que 3 SNPs, rs1695 en GSTP1, rs2333227 en el gen de la MPO y rs699512 en el gen de la biliverdina reductasa A (BLVRA) se asocian a una supervivencia peor en este grupo de pacientes (193).

Por tanto, aunque no se dispone de una evidencia suficiente basada en un gran número de estudios, parece razonable relacionar las variantes genéticas en los genes relacionados con el estrés oxidativo con la respuesta a los tratamientos en los pacientes con cáncer de pulmón.

### **1.5.3. Asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón**

Se ha observado que existe una influencia de algunos polimorfismos en genes relacionados con el EO y el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón. La mayoría de estudios han explorado polimorfismos en sistemas enzimáticos concretos, pero pocos trabajos han evaluado grupos de genes relacionados con el EO y su relación con la supervivencia.

Como hemos descrito previamente, la super-familia de enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) cataliza la detoxificación de un amplio número de sustratos y tiene un papel importante en la fase II de la biotransformación de sustancias xenobióticas. Varios estudios han investigado la relación entre polimorfismos en GSTM1 (“genotipo nulo”) y la supervivencia en cáncer de pulmón y han demostrado un impacto desfavorable en el pronóstico (194-196). GSTP1 se expresa en numerosos tejidos epiteliales y es la isoforma de GST que con mayor frecuencia se expresa en el pulmón. Los polimorfismos en GSTP1 se traducen en una reducción de su actividad enzimática. Varios estudios han demostrado que un polimorfismo en el exón 6 de GSTP1 se asocia a una supervivencia favorable en pacientes con CPNM en estadios III y IV (197, 198).

Como también hemos abordado a lo largo de esta introducción, el óxido nítrico es un radical libre implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, hasta la fecha prácticamente ningún estudio ha evaluado la influencia de los polimorfismos en los genes de NOS en el pronóstico del cáncer de pulmón. Un polimorfismo consistente en un número variable de repeticiones en tándem en el intrón 4 (VNTR) del gen eNOS cuya consecuencia en un alelo raro más pequeño (a) y un alelo común mayor (b) se ha asociado a la supervivencia en pacientes con CPNM en estadios III-IV. La mediana de supervivencia fue

significativamente mayor en los pacientes portadores del alelo a de menor tamaño (185).

No disponemos de estudios sobre polimorfismos en la xantina oxidorreductasa (XOR) o xantina deshidrogenasa (XDH) relacionados con la supervivencia en el cáncer de pulmón. Como ya hemos mencionado anteriormente, dos estudios dirigidos a examinar la expresión de XDH en tumores de pulmón obtienen resultados dispares sobre la influencia de la expresión de esta enzima en la supervivencia (115, 135). Sólo un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama, sugiere la asociación entre rs207454, un polimorfismo de XDH y la supervivencia. En el subgrupo de pacientes con receptores de progesterona negativos, este polimorfismo se asocia a una supervivencia libre de enfermedad significativamente peor (199).

## 1.6. Justificación del estudio

A la luz de lo anteriormente expuesto, es patente que los mecanismos de estrés oxidativo están implicados en numerosas condiciones patológicas, entre ellas el inicio, la promoción y la progresión del proceso de carcinogénesis.

Los pulmones, son órganos susceptibles de sufrir daños por oxidantes exógenos y por EROs endógenas generadas por células inflamatorias. De hecho, en el cáncer de pulmón se ha relacionado el nivel de EO con el pronóstico y el tratamiento y se ha sugerido que los estadios avanzados de cáncer de pulmón exhiben un nivel de EO más elevado que los estadios iniciales, lo que contribuiría a explicar la baja supervivencia en la enfermedad avanzada.

Por otra parte, los tratamientos empleados en el cáncer de pulmón generan EROs y, además, las combinaciones de quimioterapia con cisplatino inducen una disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes.

Es también frecuente observar una gran variabilidad entre individuos, tanto en la susceptibilidad para desarrollar un cáncer de pulmón como en la supervivencia y en la tasa de respuesta al tratamiento antitumoral. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) pueden ser los responsables de esta variabilidad genética.

Prácticamente no existen trabajos que aborden el estudio de variantes genéticas en genes relacionados con el estrés oxidativo en la población con cáncer de pulmón. Por tanto, nuestro estudio se plantea investigar si la diversidad genética heredada en los genes relacionados con el estrés oxidativo puede tener relación con las características de la enfermedad en el momento del diagnóstico, con la respuesta al tratamiento y con la supervivencia.

Con esa finalidad, el presente trabajo examina la asociación de 14 SNPs en genes relacionados con el estrés oxidativo que codifican proteínas productoras de radicales libres, con los factores pronósticos clásicos, la respuesta al tratamiento y la supervivencia de una población de 219 pacientes con cáncer de pulmón.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **2. HIPÓTESIS**

La presencia de polimorfismos en genes relacionados con la regulación del estrés oxidativo que codifican para enzimas productoras de radicales libres, pueden modificar el proceso de carcinogénesis en el cáncer de pulmón así como la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes que lo padecen.

## **3. OBJETIVOS**

1. Definir la relación entre un grupo de polimorfismos en genes que codifican para proteínas productoras de radicales libres, relacionados con el estrés oxidativo, y los factores pronósticos clínicos del cáncer de pulmón.
2. Conocer si existe una asociación entre la respuesta a la quimioterapia con esquemas basados en platino y la presencia de los polimorfismos seleccionados
3. Evaluar si la presencia de alguno de estos polimorfismos relacionados con el estrés oxidativo influye en la supervivencia global de los pacientes con cáncer de pulmón.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Ámbito del estudio**

El presente estudio es de ámbito hospitalario y se ha realizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Han participado tres Servicios, el Servicio de Neumología, el Servicio de Oncología Médica y la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación de Investigación Clínica de Valencia-Incliva.

### **4.2. Diseño del estudio**

Se trata de un estudio observacional retrospectivo de casos-casos, con pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, todos ellos procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

### **4.3. Población del estudio**

En 2002 el Servicio de Neumología, contando con la colaboración del Servicio de Oncología Médica y la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación de Investigación Clínica de Valencia-Incliva, puso en marcha dos proyectos de investigación dirigidos a evaluar la relación entre el riesgo de cáncer de pulmón y la presencia de polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y el metabolismo de los carcinógenos del humo del tabaco.

**Título del proyecto 1:** “Riesgo de cáncer de pulmón y polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo de los carcinógenos del humo del tabaco: glutatión S-transferasa (GST) y epóxido hidrolasa microsomal (HLY1)”.

**Agencia financiadora:** Fundación Valenciana de Neumología

**Fecha de inicio / fin del proyecto:** 2002 / 2004

**Investigador principal:** Carmen Muñoz Esteban

**Investigadores colaboradores:** María Eugenia Armengod González, Felipe Javier Chaves Martínez, José Franco Serrano y Amelia Insa Mollá

**Título del proyecto 2:** “Riesgo de cáncer de pulmón y genes productores de radicales libres”.

**Agencia financiadora:** Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña

**Fecha de inicio / fin del proyecto:** 2006 / 2009

**Investigador principal:** Felipe Javier Chaves Martínez

**Investigadores colaboradores:** María Luisa Mansego Talavera, Verónica González Albert, Ana Bárbara García García, José Franco Serrano y Sebastián Blesa Luján

Entre 2002 y 2007 se reclutaron de forma consecutiva 447 pacientes atendidos en el Servicio de Neumología para realizar el estudio diagnóstico ante la sospecha de cáncer de pulmón. Los pacientes accedieron mediante consentimiento informado a la extracción de una muestra de sangre periférica para estudiar los polimorfismos seleccionados y a su almacenamiento para utilizarla en futuros proyectos relacionados con esta línea de investigación.

Este proyecto de tesis se inició cuando se decidió evaluar el impacto de los polimorfismos en estos genes relacionados con el estrés oxidativo (EO) (genes que codifican para proteínas productoras de radicales libres) en el pronóstico, el tipo de respuesta y las características clínicas y patológicas de la población estudiada. Para ello, se analizaron retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes

con el fin de obtener los datos clínicos y evolutivos de la enfermedad.

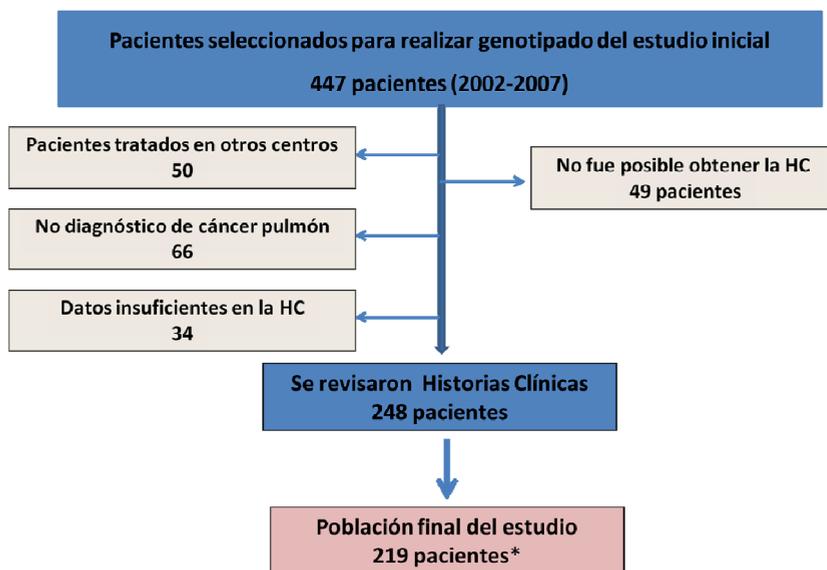
#### **4.4. Criterios de selección de la población**

Se seleccionaron los pacientes cuyo diagnóstico de cáncer de pulmón fue realizado en el periodo comprendido entre 2002 y 2007. Durante este periodo los datos en las historias clínicas fueron registrados en su mayoría por la autora de esta tesis, lo que permitió seleccionar aquellos pacientes con una información homogénea recogida por un único observador.

Nuestro objetivo fue disponer de una población de estudio lo más homogénea posible en la que se pudiera obtener de forma indispensable datos de la totalidad de las variables seleccionadas para el estudio. Se excluyeron aquellos pacientes en los que no hubo posibilidad de recuperar la historia clínica, aquellos tratados en otros centros y pacientes con datos incompletos en la historia clínica. La población final del estudio la constituyeron 219 pacientes

El diagrama de flujo (Figura 4) siguiente ilustra los motivos que obligaron a excluir pacientes del estudio, muestra el número de historias analizadas y el proceso mediante el que se alcanzó la población final definitiva de este estudio. Aunque se revisaron un total de 248 historias, por razones técnicas (ADN no viable, procesamiento de muestras no adecuado, puesta a punto de las técnicas.), se excluyeron 29 pacientes en los que no se dispuso de datos de genotipado en ninguno de los polimorfismos analizados

Figura 4: Diagrama de flujo de selección de la población de estudio



**HC (Historia Clínica)**

**.219 pacientes que dispusieron de datos de genotipado en alguno de los polimorfismos analizados.**

## 4.5. Variables del estudio

### 4.5.1. Variables demográficas

*Edad:*

Se recogió el dato en cada paciente en el momento del diagnóstico. Se recogió de manera cuantitativa para obtener mediana e intervalo intercuartílico (ICC). Para el estudio de la edad como factor pronóstico se categorizó de acuerdo con los terciles: menor de 65 años, de 65-74 años y mayor o igual de 75 años.

*Sexo:*

Hombre (codificado como 1) y Mujer (codificado como 2)

### 4.5.2. Hábitos tóxicos

*Tabaco:*

Se recogió la exposición al tabaco en forma de variable dicotómica cualitativa: Nunca fumador (codificado como 1) o fumador (codificado como 2). El término “nunca fumador” definió la situación de no exposición al tabaco o de una exposición inferior a 100 cigarrillos a lo largo de la vida.

### 4.5.3. Características clínicas dependientes del paciente

*Estado general:*

Se recogió este dato en el momento del diagnóstico. Para evaluar el estado general se utilizó la escala ECOG diseñada por el *Eastern Cooperative Oncology Group* de Estados Unidos y validada por la OMS. Es una forma práctica de medir la calidad de vida de un paciente diagnosticado de cáncer, cuyas expectativas de vida cambian en el transcurso de meses, semanas e incluso días. Esta escala valora las capacidades del paciente en su vida diaria y tiene un gran impacto en el pronóstico y en la decisión de la estrategia de tratamiento. La escala ECOG se puntúa del 0-5 y sus valores son:

- **ECOG 0:** El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y las actividades normales de la vida diaria.
- **ECOG 1:** El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desenvuelve normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
- **ECOG 2:** El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50%

del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.

- **ECOG 3:** El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
- **ECOG 4:** El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.

Para evaluar la asociación entre el estado general y el genotipo de los polimorfismos, así como su valor como factor pronóstico para la supervivencia, esta variable se agrupó en dos categorías: ECOG 0-1 (codificado como 1) y ECOG ≥ 2 (codificado como 2), de acuerdo a los criterios establecidos en la mayoría de los trabajos.

#### *Pérdida de peso:*

Es una variable clínica con valor pronóstico que se recogió en el momento del diagnóstico. Se categorizó en tres grupos: ausencia de pérdida peso (codificado como 1), pérdida de peso inferior al 10% (codificado como 2) y pérdida de peso superior al 10%(codificado como 3). Para todos los análisis estadísticos realizados se categorizó en dos grupos: ausencia de pérdida de peso (codificado como 1), presencia de pérdida de peso (codificado como 2).

#### **4.5.4. Características clínicas dependientes del tumor**

##### *Subtipo histológico:*

Todos los pacientes incluidos en el estudio disponían de un diagnóstico histológico de cáncer de pulmón emitido por el Servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro, donde existe un patólogo especializado en tumores torácicos. Se

incluyeron, tanto pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón (codificados como 1) (CPNM), como pacientes con carcinoma microcítico de pulmón (codificados como 2) (CPM). Dentro del grupo de pacientes con CPNM se definieron tres categorías: carcinomas epidermoides, adenocarcinomas y otros. Bajo el término de "otros" se agruparon los pacientes que no reunían las características de un adenocarcinoma o de un tumor epidermoide (tumores NOS, del inglés "*not otherwise specified*", tumores con histología de adenoescamoso y tumores sarcomatoides).

Se han descrito por separado las características demográficas de la población global y de las poblaciones de CPM y CPNM. El análisis de la relación entre los polimorfismos seleccionados y las variables descritas en los objetivos se ha realizado en la población global y en la población de CPNM. No se ha realizado este análisis en el grupo de CPM debido a que el tamaño muestral es pequeño, con lo que la potencia del contraste y la capacidad para detectar diferencias significativas en este grupo es muy baja.

### *Estadio Clínico*

Se evaluó el estadio clínico al diagnóstico de todos los pacientes. Aunque por el periodo de en que fueron diagnosticados estos pacientes se había utilizado la 6ª edición del Sistema de Clasificación TNM, se revisó la estadificación en cada uno de los pacientes de acuerdo con los criterios de la 7ª clasificación del sistema TNM. Se utilizó este sistema en las dos poblaciones de pacientes, CPNM y CPM. Se incluyeron todos los estadios, desde el estadio IA al estadio IV.

Para la mayoría de los test estadísticos realizados, la variable se categorizó en dos grupos: estadios I-III frente a estadios IV.

#### 4.5.5. Variables dependientes del tratamiento

##### *Quimioterapia*

Se registró si el paciente había recibido quimioterapia y se codificó como 1 (pacientes sin quimioterapia) y como 2 (pacientes con quimioterapia).

En el grupo de pacientes que recibió quimioterapia se definió la modalidad de quimioterapia administrada bajo los términos de quimioterapia adyuvante, quimioterapia preoperatoria, quimioterapia y radioterapia combinadas con intención preoperatoria, quimioterapia y radioterapia con intención radical, y quimioterapia de enfermedad avanzada. En la quimioterapia para enfermedad avanzada sólo se analizaron los esquemas utilizados como primera línea de tratamiento.

Se categorizaron los esquemas de quimioterapia en dos grupos: esquemas que no contenían platino (codificados como 1) y esquemas que contenían combinaciones con platino (codificados como 2).

Los pacientes fueron tratados con alguno de estos esquemas: Cisplatino-Gemcitabina (cisplatino 70 mg/m<sup>2</sup> y gemcitabina 1250 mg/m<sup>2</sup> días 1 y 8 cada 21 días), Carboplatino-Gemcitabina (carboplatino (AUC 5) y gemcitabina 1000 mg/m<sup>2</sup> días 1 y 8 cada 21 días), Carboplatino-Paclitaxel (carboplatino (AUC 6) y paclitaxel 200 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días); Carboplatino o Cisplatino-Etopósido (carboplatino (AUC 5) o cisplatino 80 mg/m<sup>2</sup> y etopósido 100 mg/m<sup>2</sup> días 1-3 cada 21 días), Cisplatino-Gemcitabina-Bevacizumab (cisplatino 70 mg/m<sup>2</sup> y gemcitabina 1250 mg/m<sup>2</sup> días 1 y 8 con bevacizumab 15 mg/kg cada 21 días, seguido de mantenimiento con bevacizumab tras completar 6 ciclos de la combinación), Erlotinib 150 mg vo diario, hasta la progresión de la enfermedad, Gemcitabina 1000 mg/m<sup>2</sup> días 1, 8 y 15 cada 28 días, Paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días.

### *Respuesta a la quimioterapia*

Las respuestas al tratamiento fueron determinadas por los Criterios de Evaluación de Respuesta de Tumores Sólidos (RECIST 1.0)(200) y se registraron el número de respuestas completas (RC), respuestas parciales (RP), enfermedades estables (EE) y progresiones de enfermedad (PE).

Se definió la RC como la desaparición de todas las lesiones diana y no diana. Se definió la RP como la reducción de al menos un 30% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de los diámetros basal o definida al inicio del tratamiento. Se consideró PE el incremento de al menos un 20% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia el valor menor de esta suma alcanzado durante el tratamiento. La aparición de una o más lesiones nuevas o la “progresión inequívoca” en las lesiones no diana también se consideraron criterios de progresión de enfermedad. Se definió la EE como las disminuciones o aumentos de tamaño que no reunieron los criterios definidos ni como PE ni como RP, tomando como referencia el valor menor de la suma de los diámetros alcanzado durante el tratamiento

Para el análisis de datos se agruparon las RC, RP y EE en una categoría de respondedores (codificado como 1) y la PE representó la categoría de los no respondedores (codificado como 2).

#### **4.5.6. Datos de supervivencia**

La *supervivencia global* se ha definido como el tiempo desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de muerte por cualquier causa. Todas las fechas de mortalidad fueron confirmadas en el Registro Nacional de Mortalidad

Los pacientes sin documentación de progresión o muerte en el momento del final del análisis se consideraron censurados en la fecha del último seguimiento

## **4.6. Estudio de los polimorfismos**

### **4.6.1. Extracción del ADN**

El análisis de polimorfismos se realizó en la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico de Valencia-Instituto de Investigación Clínica de Valencia (INCLIVA).

Las muestras de ADN que se utilizaron para el análisis de los polimorfismos se obtuvieron a partir de extracciones de células mononucleadas de sangre periférica (10 ml) obtenidas en el momento del diagnóstico de la enfermedad. Se utilizaron los protocolos habituales de recogida (gradiente de Ficoll-Hipaque) y conservación (criopreservación a  $-80^{\circ}$ ). El ADN genómico fue extraído de sangre periférica de células mononucleares (PB) utilizando el kit DNeasy tissue de Qiagen, (Izasa, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ADN se cuantificó por espectrofotometría, mediante la medición de la absorbancia a 260 nm. En aquellos casos en que la cantidad de DNA genómico extraído resultaba insuficiente para la realización de los estudios, se amplificó el ADN genómico

### **4.6.2. Genotipado de los polimorfismos. Análisis de los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).**

Partiendo del grupo de genes relacionados con el EO que formó parte de los proyectos de investigación iniciales dirigidos a evaluar la predisposición al cáncer

de pulmón, se realizó la selección de polimorfismos candidatos a estudiar, entre aquellos que estuvieran localizados en genes que codificaran proteínas productoras de radicales libres. En la tabla 1a se muestra el listado de los genes candidatos.

En estos genes se realizó la búsqueda de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que estuvieran localizados en la región codificante (SNPs exónicos), tanto no sinónimos, con cambio de sentido ("SNPs missense"), como sinónimos, con una frecuencia mínima del alelo menor del 5% para los SNPs missense y del 10% para los SNPs sinónimos en la población general. Los datos sobre la frecuencia del alelo menor (MAF) se obtuvieron de la Base de Datos de polimorfismos (dbSNP, "*The Single Nucleotide Polymorphism Database*") del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE.UU.).

Tabla 1a: Listado de genes candidatos (codifican proteínas productoras de radicales libres)

<b>Nombre oficial de gen</b>	<b>Denominación HGNC*</b>
Nitric-oxide synthase, brain (nNOS)	<i>NOS1</i>
Nitric oxide synthase, inducible (iNOS)	<i>NOS2A</i>
Nitric-oxide synthase, endothelial (eNOS)	<i>NOS3</i>
NADPH oxidase homolog 1	<i>NOX1</i>
NADPH oxidase 3	<i>NOX3</i>
NADPH Oxidase4	<i>NOX4</i>
NADPH Oxidase 3	<i>NOX5</i>
NADPH oxidase organizer 1	<i>NOXO1</i>
Cytochrome b-245 light chain(p22-phox)	<i>CYBA</i>
Cytochrome b-245 heavy chain (gp91-phox)	<i>CYBB</i>
Myeloperoxidase	<i>MPO</i>
Peptide methionine sulfoxide reductase	<i>MSRA</i>
Methionine-R-sulfoxide reductase B2	<i>MSRB2</i>
Neutrophil cytosol factor 1 (p47-phox)	<i>NCF1</i>
Neutrophil cytosol factor 2 (p67-phox)	<i>NCF2</i>
Neutrophil cytosol factor 4 (p40-phox)	<i>NCF4</i>
Serum paraoxonase/arylesterase 1	<i>PON1</i>
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	<i>RAC1</i>
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	<i>RAC2</i>
Xanthine dehydrogenase/oxidase	<i>XDH</i>
* HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee.	

Fruto de esta búsqueda se encontraron un total de 14 SNPs que cumplían los criterios anteriores, localizados en los siguientes genes: *NCF2* (1 SNP) *NCF4* (2 SNPs), *NOX3* (3 SNPs), *NOX5* (2 SNPs), *XDH* (2 SNPs), *NOS2* (2 SNPs) y *RAC2* (2 SNPs) (Tabla 1b).

Tabla 1b: Características de los SNPs analizados

Gen	SNP ref.	Alelos	MAF* (global) (%)	Tipo de SNP	Orientación del SNP en el mRNA	Cambio de Codón	Cambio de aminoácido	Ref SNP ' <i>taqman</i> <i>genotyping assay</i> '
<i>NCF2</i>	rs2274064	T>C	49	missense	Rev	AAG ⇒ AGG	K [Lys] ⇒ R [Arg]	C__22275052_10
<i>NCF4</i>	rs2072712	C>T	8,3	cds-synon	Fwd	TAC ⇒ TAT	Y [Tyr] ⇒ Y [Tyr]	C__15949749_10
	rs2075939	C>T	17	missense	Fwd	CCG ⇒ CTG	P [Pro] ⇒ L [Leu]	C__2481208_1
<i>NOX3</i>	rs12195525	G>T	13	cds-synon	Rev	CGA ⇒ AGA	R [Arg] ⇒ R [Arg]	C__2468061_10
	rs231954	T>C	46	cds-synon	Rev	GAA ⇒ GAG	E [Glu] ⇒ E [Glu]	C__2468029_10
	rs34960420	G>A	13	cds-synon	Fwd	CCG ⇒ CCA	P [Pro] ⇒ P [Pro]	C__25985107_10
<i>NOX5</i>	rs2277552	C>T	8	missense	Rev	CGC ⇒ CAC	R [Arg] ⇒ H [His]	C__15884718_10
	rs12907196	C>T	27	missense	Fwd	CTC ⇒ TTC	L [Leu] ⇒ F [Phe]	C__1481224_10
<i>XDH</i>	rs17011368	T>C	5	missense	Rev	ATA ⇒ GTA	I [Ile] ⇒ V [Val]	C__25472962_20
	rs1884725	G>A	20	cds-synon	Rev	TTC ⇒ TTT	F [Phe] ⇒ F [Phe]	C__3279863_30
<i>NOS2</i>	rs2297518	G>A	16	missense	Rev	TCG ⇒ TTG	S [Ser] ⇒ L [Leu]	C__11889257_10
	rs1060826	G>A	27	cds-synon	Fwd	ACG ⇒ ACA	T [Thr] ⇒ T [Thr]	C__9458082_10
<i>RAC2</i>	rs2239774	G>C	19	cds-synon	Rev	GCC ⇒ GCG	A [Ala] ⇒ A [Ala]	C__16175574_20
	rs1064498	T>C	25	cds-synon	Fwd	GCT ⇒ GCC	A [Ala] ⇒ A [Ala]	C__15853764_10

**Abreviaturas:** Rev: reverse (orientación inversa). Fwd: forward (orientación directa). MAF "*Minor allele frequency*" (frecuencia del alelo menor). cds-synon: SNP sinónimo de la secuencia codificante. Missense: SNP no sinónimo. SNP ref: referencia del SNP

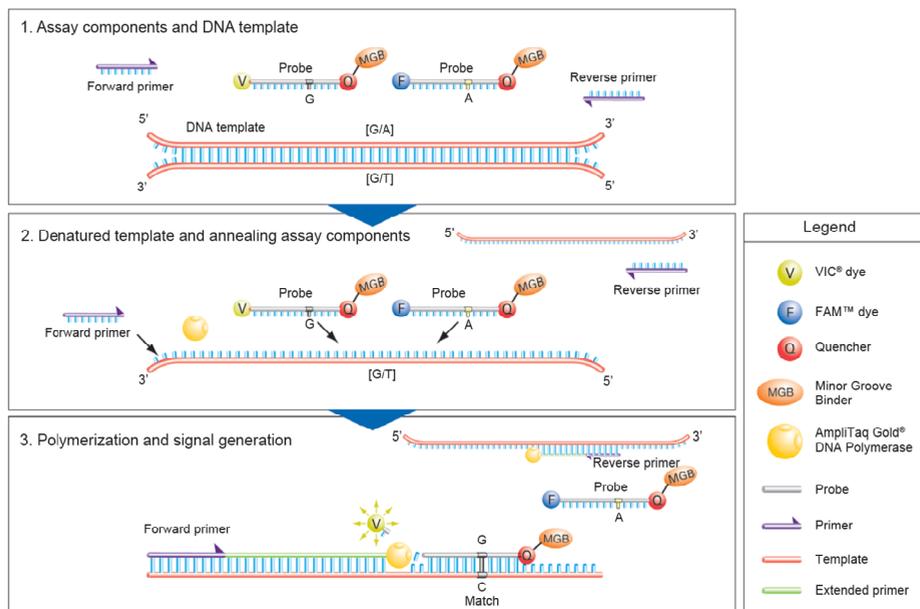
### 4.6.3. Fundamento de la técnica de genotipado

El genotipado de los polimorfismos se realizó mediante la utilización de la PCR alelo específica con sondas Taqman ("*Applied Biosystems*").

La técnica se basa en la amplificación mediante PCR de la región contigua al SNP en presencia de dos cebadores que hibridan en la región contigua al SNP, y dos oligonucleótidos marcados fluorescentemente que reconocen específicamente cada uno de los alelos posibles del SNP (sondas Taqman alelo-específicas).

En la figura 5 se representa esquemáticamente el fundamento de la discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

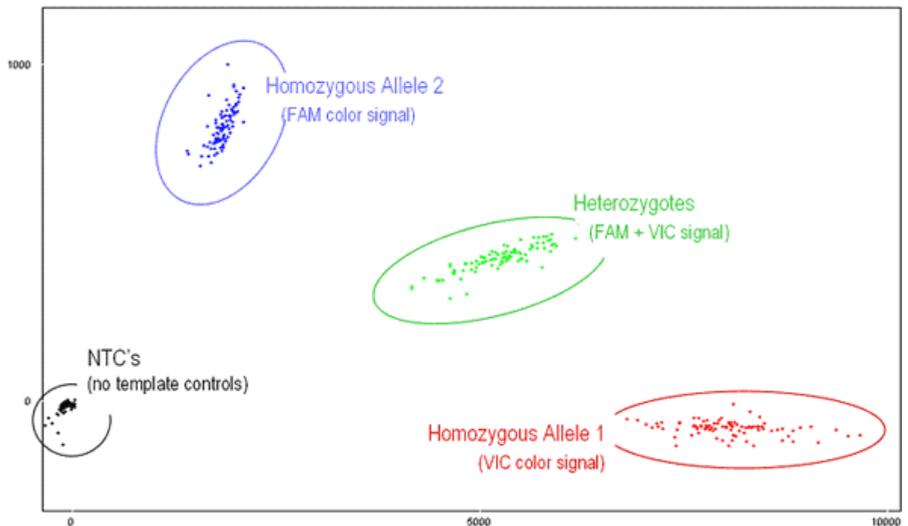
Figura 5: Representación gráfica de PCR con sondas Taqman: discriminación alélica



Cada sonda Taqman consta de un oligonucleótido que hibrida en la región contigua al SNP de manera que el nucleótido del extremo 3' es el que coincide con la posición del SNP. La secuencia de cada sonda se diferencia pues, sólo en el último nucleótido, y cada uno de ellos hibrida con cada uno de los posibles alelos del SNP. Cada oligonucleótido tiene unido un fluoróforo que emite a una longitud de onda distinta: fluoróforos FAM (longitud de onda de emisión  $\lambda_e=518$  nm) y fluoróforos VIC ( $\lambda_e=554$  nm). Cada fluoróforo está unido al extremo 5' del

oligonucleótido y en el extremo 3' tiene unida una molécula "*quencher*" (apantalladora). Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia del fluoróforo queda apantallada por el "*quencher*". Durante la etapa de amplificación PCR, si la sonda alelo-específica es complementaria al alelo del SNP, se unirá a su cadena complementaria. Cuando la Taq polimerasa que sintetiza la cadena complementaria desde los cebadores llega a la región donde se encuentra hibridada la sonda, la degrada con su actividad exonucleasa 5'-3'. La degradación de la sonda hibridada libera el fluoróforo, de forma que la fluorescencia aumenta según aumenta la cantidad de producto de PCR alelo específico. Si un determinado alelo no se encuentra presente, la sonda específica de ese alelo no es perfectamente complementaria, y no se une tan eficientemente a la secuencia que contiene el SNP. Esto evita que actividad exonucleasa de la Taq polimerasa degrade la sonda y se libere el fluoróforo. Si ambos alelos se encuentran presentes, ambos fluoróforos darán señal, mientras que en el caso de muestras de individuos homocigotos para cada uno de los alelos observaremos sólo un tipo de señal fluorescente (FAM o VIC). Por tanto el patrón de fluorescencias después de la PCR, cuantificado con un equipo de detección de fluorescencia, determina el genotipo, según se indica en la figura 6.

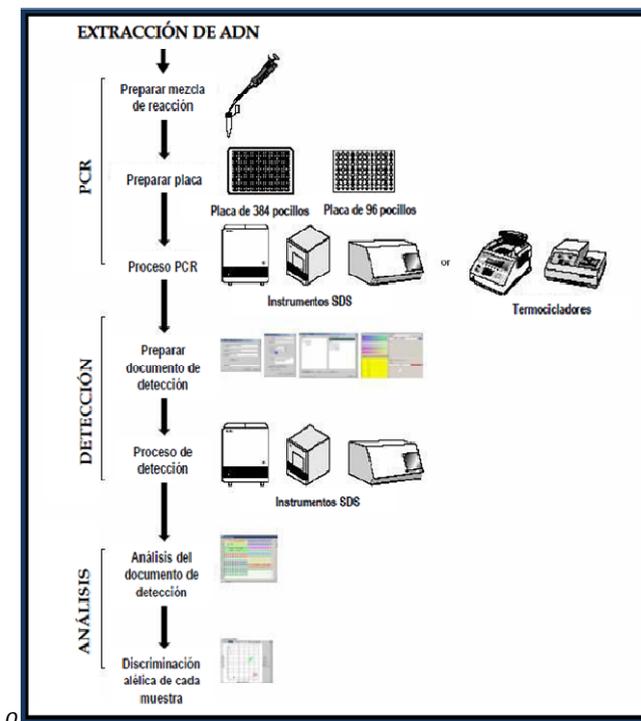
Figura 6: Patrón de fluorescencias de la PCR



Cada reacción de PCR se prepara con 2,5  $\mu$ l de Taqman Genotyping Master Mix 2X (mezcla de reacción que incluye la Taq polimerasa), que incluye 0,12ul de "Taqman SNP genotyping assay" 40x (mezcla que incluye los cebadores y las sondas taqman) y 2,5  $\mu$ l de DNA de la muestra a una concentración de 5 $\mu$ g/ml.

La reacción de PCR se realizó en un equipo de PCR a tiempo real (Real Time ABI PRISM® 7900 Sequence Detector de Applied Biosystems) o en un termociclador convencional. Las condiciones de la amplificación fueron, una primera fase a 50°C durante 2 minutos, una segunda fase a 95°C durante 10 minutos y una tercera fase que consistía en 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. La lectura de la fluorescencia se realizó en el equipo Real Time ABI PRISM® 7900 Sequence Detector (Figura 7).

Figura 7: Mecanismo de la PCR con sondas Taqman. Salida de la señal del equipo



#### 4.7. Análisis estadístico

Las pruebas de asociación entre las variables no temporales del estudio (como el estadio, el ECOG, la pérdida de peso, la respuesta al tratamiento etc.) y los polimorfismos, fueron realizadas con el programa SNPStats, una aplicación estadística online para el análisis de SNPs, desarrollada por el Instituto Catalán de Oncología (201). Cuando la variable de respuesta es categórica binaria, la aplicación asume un diseño de caso-control no pareado y se utilizan modelos de regresión logística no condicionales. El análisis de regresión logística se expresa mediante frecuencias de genotipado, proporciones, razón de proporciones (OR, del inglés "odds ratio") e intervalos de confianza del 95% de las diferencias (ICs

95%) para cada modelo genético de herencia (dominante, recesivo, aditivo, codominante y sobredominante). Si la variable de respuesta es cuantitativa, se asume una única población y se utilizan modelos de regresión lineal para evaluar la proporción en la variación de la respuesta relacionada con los SNPs. La regresión lineal se especifica mediante medias, errores estándar, diferencias en las medias respecto a la categoría de referencia (el genotipo o haplotipo más frecuente), y el intervalo de confianza del 95% de las diferencias (IC 95%)

En el estudio se evaluaron 5 modelos genéticos:

*Modelo dominante:* Una sola copia del alelo menor (por ejemplo G) es suficiente para modificar el riesgo y el ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud, es decir que, tanto los portadores del genotipo AG, como los del GG tienen el mismo riesgo. En este modelo se comparan por tanto los portadores del alelo menor G (genotipos AG + GG) con los no portadores (genotipo AA).

*Modelo recesivo:* Hacen falta dos copias de la variante G para modificar el riesgo: los heterocigotos (AG) y los homocigotos del alelo de mayor frecuencia (AA) tienen el mismo riesgo, de tal forma que el genotipo GG se compara con AG + AA.

*Modelo codominante:* Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se realizan las comparaciones de los genotipos por parejas (AA vs AG, y AA vs GG)

*Modelo sobredominante:* Los individuos homocigotos para el genotipo más frecuente (AA) y el genotipo variante (GG) tienen el mismo riesgo y este es diferente al de los individuos heterocigotos (AG). En este modelo se comparan los individuos homocigotos (AA+GG) con los heterocigotos (AG).

*Modelo aditivo:* Cada copia de G modifica el riesgo en una cantidad aditiva, por lo tanto los homocigotos GG tienen el doble de riesgo que los heterocigotos AG. Supone que cada copia de G modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala

logit); por tanto los homocigotos GG tienen el doble de riesgo que los heterocigotos AG. Se compara la combinación ponderada donde se da peso 1 a los heterocigotos AG y peso 2 a los homocigotos GG

Para la selección del mejor modelo para cada polimorfismo, la herramienta SNPstats también calcula el criterio de información Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC). Estos criterios determinan la idoneidad de fijar un modelo estadístico estimado considerando el número de observaciones y el número de parámetros estimados (202). El mejor modelo que se ajusta a los datos es aquel que presenta los valores más bajos de AIC y BIC.

Para determinar el nivel de significación estadística y disminuir el efecto de comparaciones múltiples, se utilizó el método de Bonferroni, que ajusta el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos. El nivel de significación para cada prueba se calcula dividiendo el error global de tipo I entre el número de pruebas a realizar (en este caso por el número de SNPs que hay que evaluar). Tras realizar la corrección de Bonferroni, se consideraron estadísticamente significativos los valores de p menores de 0,0035. Los valores de p entre 0,05-0,0035, se consideraron marginalmente significativos.

La evaluación de la relación entre los polimorfismos y la respuesta al tratamiento se realizó mediante regresión logística binaria para calcular los odds ratios y el intervalo de confianza del 95% de forma univariada y multivariada, esta última, mediante el método de introducir para ajustar para las variables independientes seleccionadas.

Para evaluar la relación entre los polimorfismos y la supervivencia se utilizaron los métodos de Kaplan-Meier y de regresión de Cox. El método de Kaplan-Meier se utilizó para obtener la representación gráfica de las curvas de supervivencia estimadas en función de las variables del estudio, que se compararon mediante la prueba de los rangos logarítmicos. Los modelos de regresión de Cox univariados y

multivariados se utilizaron para estimar la influencia de cada variable en la supervivencia. Para la evaluación de los polimorfismos se seleccionaron tres modelos de herencia (dominante, recesivo y aditivo). Estas pruebas estadísticas se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.0. Todas las variables asociadas con un valor de  $p < 0,05$  en el análisis univariado se incluyeron en el modelo multivariado utilizando el método por pasos hacia adelante. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p$  menores de  $<0,05$ . Adicionalmente, para analizar la relación entre las variables independientes y cada una de las variables 'respuesta' definidas (supervivencia global y respuesta al tratamiento) se realizaron también los estudios multivariados en la población global y en la población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico por separado mediante la metodología CART (*Classification and regression trees*).

La metodología CART es un sistema de organización de variables que permite analizar qué variables pueden servir como predictoras, sus interacciones y si el modelo resultante puede ser útil en la práctica asistencial. Esta metodología permite construir árboles de decisión mediante una serie de reglas sobre las decisiones tomadas para asignar un valor de salida a una determinada entrada, mediante divisiones binarias sucesivas. Esto es, se divide cada nodo madre en dos nodos hijos homogéneos mediante la aplicación de respuestas sí/no en cada nodo de decisión. Las etapas para la generación del modelo son: a) Construcción del árbol; b) Parada del proceso de crecimiento del árbol (se construye un árbol máximo que sobreajusta la información contenida en la base de datos); c) Podado del árbol haciéndolo más sencillo y dejando sólo los nodos más importantes y, por último; d) Selección del árbol óptimo con capacidad de generalización. Se utilizó el software SSPS 20.0 (SPSS, Illinois, Inc; USA), método de crecimiento por medio de CART, con análisis de sensibilidad basado en el método de Gini (203) y sistema de validación cruzada. En el árbol final, cada grupo tenía al menos 10 casos.

#### **4.8. Justificación ética del estudio**

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Institución y por el Comité de Ensayos Clínicos e Investigación Clínica.

Todos los pacientes reclutados accedieron mediante un consentimiento informado a la extracción de una muestra de sangre periférica para el análisis de polimorfismos. El consentimiento informado expresaba la posibilidad de destinar parte del suero y plasma a otros proyectos de investigación y contenía el compromiso de guardar la confidencialidad de los datos personales y de comunicar a los sujetos participantes todos los datos que pudieran tener interés para su salud



# **RESULTADOS**

---



## 5. RESULTADOS

Los análisis dirigidos a evaluar los objetivos planteados en esta tesis se realizaron en el global de la población y, de forma específica, en la población con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). No se evaluaron en la población con carcinoma de pulmón microcítico (CPM) porque el número de pacientes no era adecuado para obtener resultados estadísticamente significativos.

### 5.1. Características de la población

#### 5.1.1. Características de la población global:

Las características de los 219 pacientes que constituyen la población final del estudio se encuentran recogidas en la Tabla 2. La mediana de edad fue de 70 años, con un intervalo intercuartílico (ICC) entre 60-76 años. Un 87% de los pacientes correspondían a varones. (Figura 8). Un 93.2% de la población se definió como fumadora. Del total de pacientes, 39 (17,8%) tenían un carcinoma de pulmón microcítico (CPM) y 180 (82,2%) un cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La distribución de la histología en números absolutos de pacientes está representada en la Figura 9.

Por lo que respecta a los factores pronósticos clásicos (estadio, ECOG y pérdida de peso), un 19% de los pacientes presentaron al diagnóstico estadios iniciales (I-II), un 33% se diagnosticaron en estadios localmente avanzados (IIIA y IIIB) y un 48% de la población se diagnosticó de inicio con una enfermedad metastásica (estadio IV). Un 43% de pacientes presentaban un EGOG  $\geq 2$  al diagnóstico y 88 (40%) una

pérdida de peso, que fue superior al 10% en 36 (16%). Estos factores pronósticos referidos están representados en la Figura 10

Figura 8: Distribución de la edad y el sexo en la población global (N=219)

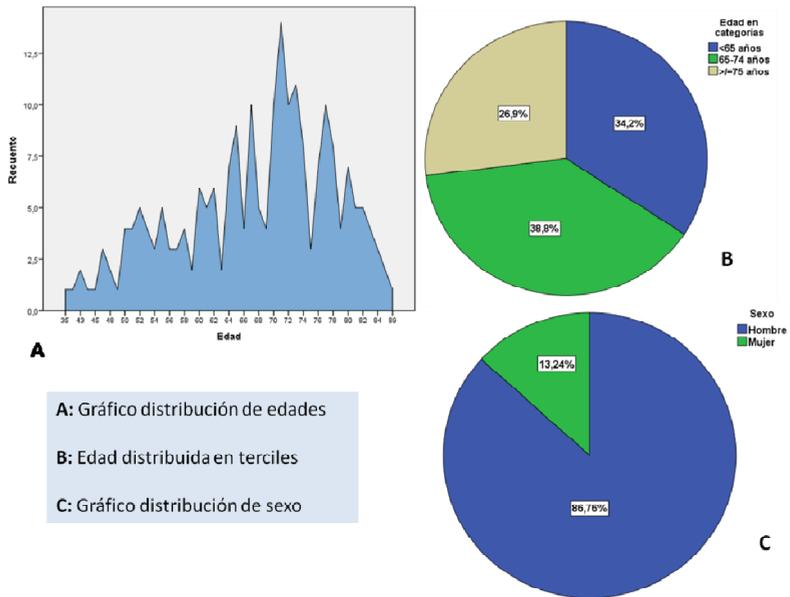


Figura 9: Distribución de las histologías en la población global (N=219)

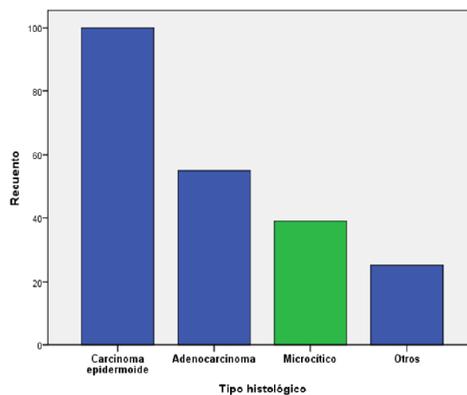
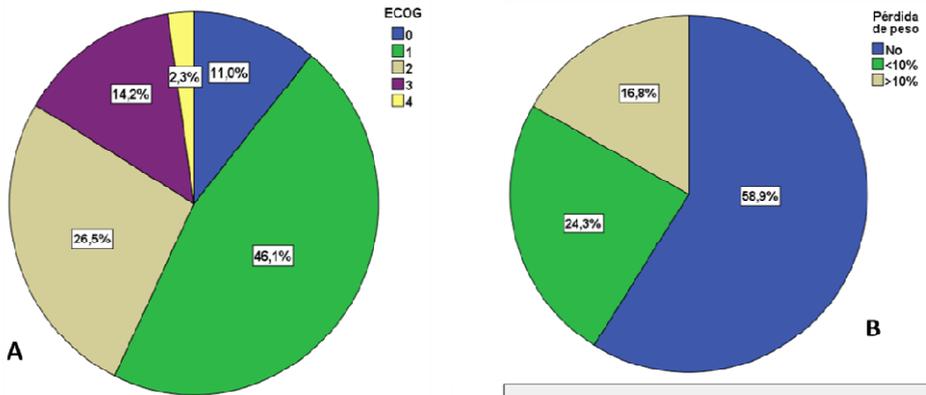


Gráfico de barras de distribución de histologías

Figura 10: Distribución de los factores pronósticos clásicos en la población global (N=219)



**A:** Gráfico distribución de ECOG  
**B :** Gráfico de distribución de pérdida de peso  
**C:** Gráfico distribución de Estadios

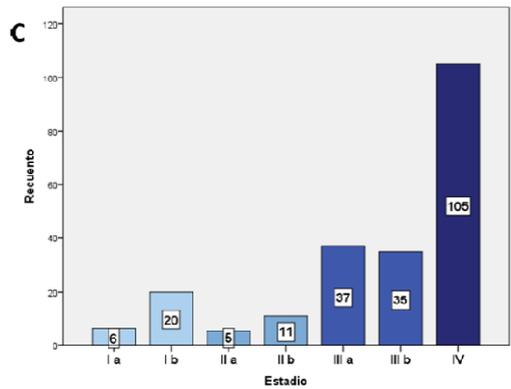


Tabla 2: Características demográficas de la población global (N=219)

Características	Número de pacientes	%
Edad (años)		
Mediana	70	
Intervalo intercuartílico (ICC)	(60-76)	
<65	75	34,2
65-74	85	38,8
≥ 75	59	26,9
Sexo		
Hombre	190	86,8
Mujer	29	13,2
Hábito tabáquico		
Nunca fumador	15	6,8
Fumador	204	93,2
Estado general (ECOG)		
0-1	125	57,1
≥ 2	94	42,9
Pérdida de peso		
No	126	57,5
<10%	52	23,7
>10%	36	16,4
Desconocida	5	2,3
Tipo histológico		
Carcinoma microcítico	39	17,8
Carcinoma no microcítico	180	82,2
- Epidermoide	100	45,7
- Adenocarcinoma	55	25,1
- Otros	25	11,4
Estadio		
Ia	6	2,7
Ib	20	9,1
IIa	5	2,3
IIb	11	5,0
IIIa	37	16,9
IIIb	35	16,0
IV	105	47,9
Tratamiento quimioterápico		
No	77	35,2
Sí	142	64,8
Tipo de quimioterapia		
Esquemas con platino	137	96,5
Esquemas sin platino	5	3,5

### **5.1.2. Características de la población con cáncer de pulmón no microcítico.**

Un total de 180 pacientes diagnosticados de un CPNM fueron incluidos en el estudio. En la Tabla 3 están recogidas las características de esta población. La mediana de edad fue de 70 años (ICC 61-76 años). Un 87% de los pacientes correspondían a varones. La distribución de la edad y el sexo quedan ilustrados en la Figura 11. Un 93.2% de la población se definió como fumadora. En lo referente a la distribución de los subtipos histológicos, un 55,5 % de pacientes presentaron histología de tumor epidermoide, un 30,5% correspondieron adenocarcinomas y un 13,9% a otro tipo de histologías (Figura 12). Por lo que respecta a los factores pronósticos, un 44% de pacientes presentaban un EGOG  $\geq 2$  al diagnóstico y un 41% una pérdida de peso, que fue superior al 10% en un 19%. Un 23% de pacientes se diagnosticaron en estadios iniciales (I-II), un 30% en estadio III y un 47% en estadio IV (Figura 13).

La población de pacientes fue diagnosticada en un periodo donde no se determinaban de forma rutinaria la presencia de mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Siete pacientes presentaron mutaciones EGFR (5 pacientes presentaron histología de adenocarcinoma y 2 pacientes de epidermoide). Tres de estos pacientes recibieron tratamiento con erlotinib como estrategia de primera línea. Los restantes 4 pacientes recibieron quimioterapia basada en platino como tratamiento de primera línea.

Figura 11: Distribución de la edad y el sexo en la población con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). (N=180)

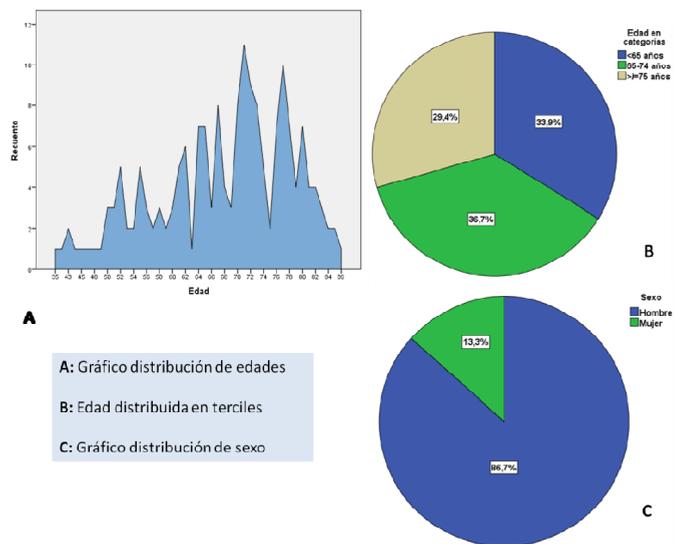


Figura 12: Distribución de la histología en la población de CPNM (N=180)

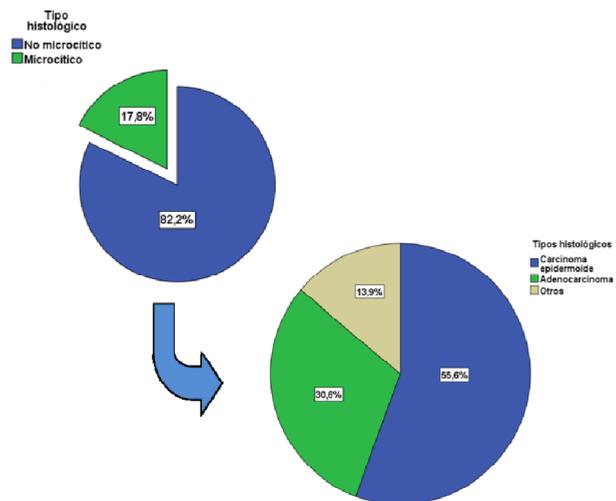


Figura 13: Distribución de los factores pronósticos clásicos en la población de CPNM (N=180)

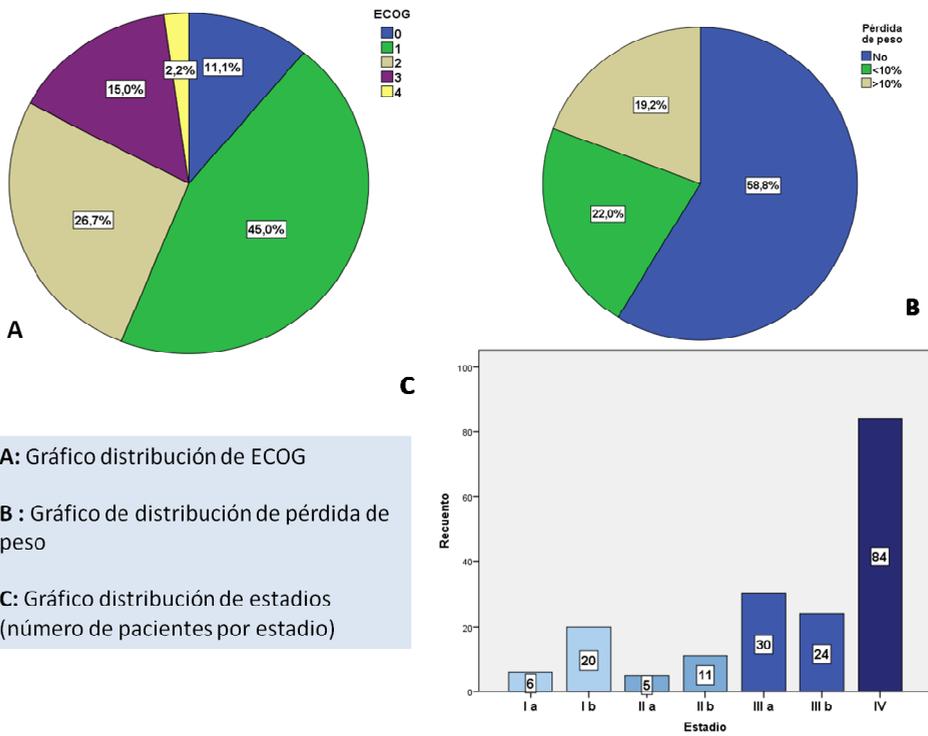


Tabla 3: Características demográficas la población con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) (N=180)

Características	N	%
Edad (años)		
Mediana	70	
Intervalo Inter cuartílico	(61-76)	
<65	61	33,9
65-74	66	36,7
≥75	53	29,4
Sexo		
Hombre	156	86,7
Mujer	24	13,3
Hábito tabáquico		
Nunca fumador	12	6,7
Fumador	68	93,3
Estado general (ECOG)		
0-1	101	56,1
≥ 2	79	43,9
Pérdida de peso (v.p.=3)		
No	104	58,8
<10%	39	22,0
>10%	34	19,2
Tipo histológico		
Epidermoide	100	55,5
Adenocarcinoma	55	30,5
Otros	25	13,9
Estadio		
I-II	42	23,3
III	54	30,0
IV	84	46,7
Tratamiento quimioterápico		
No	72	40,0
Si	108	60,0
Tipo de quimioterapia		
Esquemas con platino	103	95,4
Esquemas sin platino	5	4,6
Modalidad de quimioterapia		
Adyuvante	11	10,2
Preoperatoria	18	16,7
Quimio-radioterapia preoperatoria	4	3,7
Quimio-radioterapia radical	14	12,9
Enfermedad avanzada	61	56,5
Respuesta a la quimioterapia*		
RC/RP	43	48,3
EE	22	24,7
PE	24	26,9

\* sólo en aquellos pacientes que recibieron quimioterapia y fue posible evaluar la respuesta

### **5.1.3. Características de la población con cáncer de pulmón microcítico.**

Un total de 39 pacientes se incluyeron con el diagnóstico de un carcinoma microcítico de pulmón (CPM). La mediana de edad, la distribución por sexo y el hábito tabáquico no fue diferente al de la población con CPNM. Las frecuencias en los factores pronósticos clásicos (EGOG y pérdida de peso) tampoco fueron diferentes a las presentadas en los pacientes con CPNM. Los pacientes se presentaron al diagnóstico sólo con estadios avanzados o localmente avanzados. Un 87% de pacientes recibieron quimioterapia, y la tasa de respuestas fue del 89,3%. De esta población sólo describiremos las características demográficas (Tabla 4). El tamaño de esta muestra no hizo posible analizar las asociaciones de los polimorfismos.

Tabla 4: Características demográficas la población con cáncer de pulmón microcítico (CPM)

(N=39)

Características	N	%
Edad (años)		
Mediana	68	
Intervalo intercuartilico	(58-73)	
<65	14	35,9
65-74	19	48,7
≥75	6	15,4
Sexo		
Hombre	34	87,2
Mujer	5	12,8
Hábito tabáquico		
Nunca fumador	3	7,7
Fumador	36	92,3
Estado general (ECOG)		
0-1	24	61,5
≥ 2	15	38,5
Pérdida de peso (v.p.=2)		
No	22	59,5
<10%	13	35,1
>10%	2	5,4
Estadio		
I-II	0	0
III	18	46,2
IV	21	53,8
Tratamiento quimioterápico		
No	5	12,8
Si	34	87,2
Tipo de quimioterapia		
Esquemas con platino	34	100
Esquemas sin platino	0	0
Modalidad de quimioterapia		
Quimio-radioterapia radical	14	41,2
Enfermedad avanzada	20	58,8
Respuesta a la quimioterapia*		
RC/RP	25	89,3
EE	1	3,6
PE	2	7,1
Leyenda: * sólo en aquellos pacientes que recibieron quimioterapia y fue posible evaluar la respuesta		

## **5.2. Características del tratamiento**

### **5.2.1. Población global**

Recibieron quimioterapia un 65% de pacientes (Figura 14) y los esquemas administrados incluyeron cisplatino o carboplatino en más del 96% de los casos. Por su relevancia y su frecuencia, este último grupo es el que se evaluó para analizar el impacto de los polimorfismos en la respuesta.

### **5.2.2. Población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico**

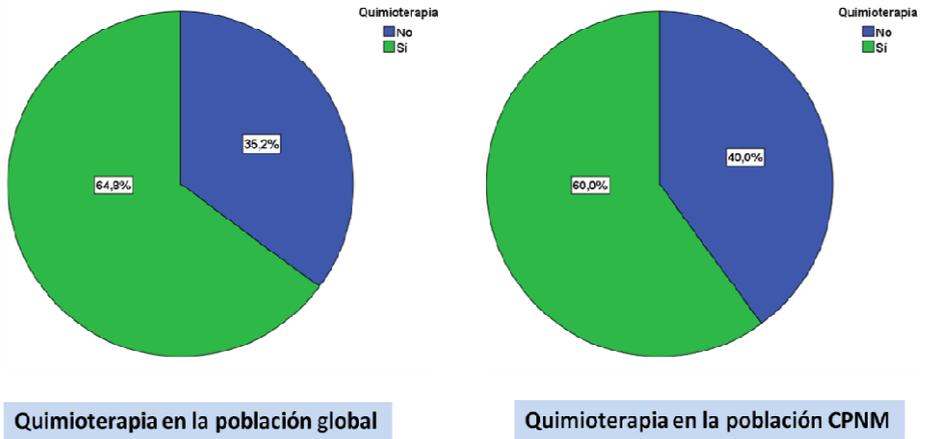
Un 60% de los pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia (Tabla3; Figura 14). La mayoría (56,5%) recibió quimioterapia de enfermedad avanzada. El resto recibió otro tipo de modalidades de quimioterapia. Un 10% fue tratado con quimioterapia adyuvante, un 20% recibió tratamiento preoperatorio con quimioterapia y combinaciones de quimioterapia y radioterapia y en un 13% se administró quimioterapia y radioterapia (secuencial o concurrente) con intención radical.

En el grupo de pacientes en que se pudo evaluar la respuesta a la quimioterapia, un 48% de pacientes presentaron respuesta a la quimioterapia (RC y RP). Un 27 % presentaron PE como mejor respuesta a la quimioterapia.

### **5.2.3. Población de pacientes con cáncer de pulmón microcítico**

Un 87% de pacientes recibieron quimioterapia, todos ellos con esquemas con platino, y la tasa de respuestas, en los casos en que se pudo evaluar (28 pacientes), fue del 89,3%. El tipo de modalidades de quimioterapia que se administraron queda reflejado en la Tabla 4.

Figura 14: Distribución de la quimioterapia en la población del estudio



### 5.3. Resultados del genotipado

Se realizó el genotipado de los 14 SNPs estudiados en los 219 pacientes. El genotipado fue válido en el 95,46% de las muestras (2927 de 3066). En la tabla siguiente (tabla 5) se describen las frecuencias alélicas menores (MAF) para cada SNP en la población global estudiada, así como las frecuencias de los genotipos de todos los SNPs. Las frecuencias alélicas menores fueron calculadas obteniendo la proporción en la que se observa el alelo menor respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado. La distribución de los genotipos en todos los SNPs se encontró en concordancia con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 5: Distribución de las frecuencias alélicas en la población global (N=219)

Gen	SNP ref.	MAF	Genotipo	N (%)
NCF2	rs2274064 T>C	44%	TT	63 (31%)
			TC	100 (49%)
			CC	40 (20%)
			NE	16
NCF4	rs2072712 C>T	10%	CC	169 (79%)
			CT	44 (21%)
			T/T	0 (0%)
			NE	6
	rs2075939 C>T	15%	CC	151 (71%)
			CT	58 (27%)
TT			4 (2%)	
NE	6			
NOX3	rs12195525 G>T	12%	GG	165 (78%)
			GT	45 (21%)
			TT	2 (1%)
			NE	8
	rs231954 T>C	40%	TT	75 (37%)
			TC	90 (45%)
			CC	36 (18%)
			NE	18
	rs34960420 G>A	11%	GG	167 (77%)
			GA	43 (23%)
AA			2 (1%)	
NE	7			
NOX5	rs2277552 C>T	3%	CC	193 (95%)
			CT	11 (5%)
			TT	0 (0%)
			NE	15
	rs12907196 T>C	46%	TT	67 (31%)
			TC	74 (44%)
CC			52 (24%)	
NE	6			
XDH	rs17011368 T>C	7%	TT	184 (86%)
			TC	31 (14%)
			CC	0 (0%)
			NE	5
	rs1884725 G>A	25%	GG	113 (53%)
			GA	89 (41%)
AA			13 (6%)	
NE	4			
NOS2	rs2297518 G>A	16%	GG	139 (70%)
			GA	55 (28%)
			AA	5 (3%)
			NE	20
	rs1060826 G>A	47%	GG	58 (27%)
			GA	115 (53%)
AA			43 (20%)	
NE	3			
RAC2	rs2239774 G>C	17%	GG	146 (69%)
			GC	60 (28%)
			CC	6 (3%)
			NE	7
	rs1064498 T>C	17%	TT	135 (67%)
			TC	62 (31%)
			CC	4 (2%)
			NE	18

MAF: Frecuencia alélica menor. SNP ref: referencia del SNP  
NE: No evaluables

En la tabla 6 se detalla la distribución de los genotipos de los SNPs en la población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

Tabla 6: Distribución de los genotipos de los SNPs en la población de CPNM(N=180)

Gen	SNP ref	Genotipo	N (%)
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	51 (30,4%)
		C/T	85 (50,6%)
		C/C	32 (19,1%)
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	136 (77,7%)
		C/T	39 (22,3%)
		T/T	0
	rs2075939 C>T	C/C	125 (71,8%)
		C/T	47 (27%)
		T/T	2 (1,1%)
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	139 (79,9%)
		G/T	33 (19%)
		T/T	2 (1,1%)
	rs231954 T>C	T/T	64 (39%)
		C/T	71 (43,3%)
		C/C	29 (17,7%)
	rs34960420 G>A	G/G	141 (80,6%)
		A/G	32 (18,3%)
		A/A	2 (1,1%)
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	160 (95,2%)
		C/T	8 (4,8%)
		T/T	0
	rs12907196 T>C	T/T	55 (31,4%)
		C/T	78 (44,6%)
		C/C	42 (24%)
XDH	rs17011368 T>C	T/T	148 (84,1%)
		C/T	28 (15,9%)
		C/C	0(0%)
	rs1884725 G>A	G/G	87 (49,4%)
		A/G	79 (44,9%)
		A/A	10 (5,7%)
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	116 (71,2%)
		A/G	44 (27%)
		A/A	3 (1,8%)
	rs1060826 G>A	G/G	51 (28,8%)
		A/G	90 (50,9%)
		A/A	36 (20,3%)
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	120 (69,4%)
		C/G	48 (27,8%)
		C/C	5 (2,9%)
	rs1064498 T>C	T/T	108 (65,8%)
		C/T	52 (31,7%)
		C/C	4 (2,4%)

La distribución de las frecuencias alélicas en la población de CPNM no fue diferente la distribución observada en la población de cáncer de pulmón microcítico (CPM). La tabla de comparación de frecuencias en estas dos poblaciones está disponible como material suplementario.

## **5.4. Relación de los polimorfismos con los factores pronósticos clásicos en cáncer de pulmón**

### **5.4.1. Población global**

En la población global de 219 pacientes se evaluó la asociación de los 14 SNPs seleccionados con los factores pronósticos clínicos clásicos en cáncer de pulmón: el ECOG, la pérdida de peso y el estadio. Se evaluaron los 5 modelos genéticos descritos previamente en los 14 SNPs. El análisis se ajustó para el sexo y la edad.

ECOG: Se valoró el ECOG en dos categorías: 0-1 frente 2-4. La tabla 7 muestra los resultados de la asociación entre el ECOG y el genotipo. Como se observa, sólo el SNP *NCF4* rs2075939 (C>T) se asoció marginalmente con el ECOG. Los pacientes con ECOG 0-1 presentaron con mayor frecuencia el alelo menor T (18,6%) que los pacientes con ECOG 2-4 (11,4%), lo cual indica que los pacientes portadores del alelo menor T exhibían un riesgo menor de presentar un ECOG =2-4, de acuerdo con un modelo aditivo, en el que cada copia del alelo T disminuye a la mitad el riesgo de presentar un ECOG entre 2 y 4 (OR:0,52; IC 95% OR: 0,29-0,93; p=0,023).

Estadio: Se categorizó en dos grupos: estadios I-III frente a estadios IV. La tabla 8 muestra los resultados del test de asociaciones entre el estadio y el genotipo de los SNPs. Nuevamente, el SNP *NCF4* rs2075939(C>T) presentó una asociación estadísticamente significativa con esta variable. Los pacientes diagnosticados en

estadios I-III presentaron una mayor frecuencia del alelo menor T de NCF4 (22%) que los pacientes en estadio IV (8,6%), lo que indica que los pacientes portadores del alelo menor T presentaban un menor riesgo de enfermedad metastática de acuerdo con un modelo aditivo, en el que cada copia del alelo T disminuye tres veces el riesgo de presentar la enfermedad en estadio IV (OR:0,31; IC 95% OR: 0,17-0,58;  $p=0,0001$ ).

Pérdida de peso: Se evaluó el peso en dos categorías: ausencia de pérdida de peso (codificado como 1), presencia de pérdida de peso (codificado como 2). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre esta variable y ninguno de los SNPs estudiados. La tabla 9 muestra el estudio de asociación entre los distintos polimorfismos y el factor pronóstico pérdida de peso en la población global.

Tabla 7: Asociaciones de los 14 SNPs con el ECOG en la población global (N= 219). Resultados del análisis univariado ajustado por edad y sexo.

Gen	SNP ref,	Genotipo	ECOG 0-1 N (%)	ECOG 2- 4 N (%)	OR(95%CI)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	31 (27,4%)	32 (35,6%)	0,68 (0,38-1,19)	0,17 OD
		C/T	61 (54%)	39 (43,3%)		
		C/C	21 (18,6%)	19 (21,1%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	92 (75,4%)	77 (84,6%)	0,60 (0,29-1,22)	0,15 D*
		C/T	30 (24,6%)	14 (15,4%)		
		T/T	0(0%)	0(0%)		
	rs2075939 C>T	C/C	79 (65,3%)	72 (78,3%)	<b>0,52</b> <b>(0,29-0,93)</b>	<b>0,023</b> <b>A</b>
		C/T	39 (32,2%)	19 (20,6%)		
		T/T	3 (2,5%)	1 (1,1%)		
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	93 (77,5%)	72 (78,3%)	0,00 (0,00-NA)	0,12 R
		G/T	25 (20,8%)	20 (21,7%)		
		T/T	2 (1,7%)	0 (0%)		
	rs231954 T>C	T/T	42 (36,2%)	33 (38,8%)	1,29 (0,61-2,74)	0,51 R
		C/T	54 (46,5%)	36 (42,4%)		
		C/C	20 (17,2%)	16 (18,8%)		
	rs34960420 G>A	G/G	93 (77,5%)	74 (80,4%)	0,00 (0,00-NA)	0,12 R
		A/G	25 (20,8%)	18 (19,6%)		
		A/A	2 (1,7%)	0 (0%)		
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	108 (94,7%)	85 (94,4%)	0,93 (0,27-3,18)	0,9 D*
		C/T	6 (5,3%)	5 (5,6%)		
		T/T	0(0%)	0(0%)		
	rs12907196 T>C	T/T	37 (30,6%)	30 (32,6%)	0,83 (0,47-1,45)	0,51 OD
		C/T	56 (46,3%)	38 (41,3%)		
		C/C	28 (23,1%)	24 (26,1%)		
XDH	rs17011368 T>C	T/T	109 (89,3%)	75 (80,7%)	1,90 (0,87-4,17)	0,11 D*
		C/T	13 (10,7%)	18 (19,4%)		
		C/C	0(0%)	0(0%)		
	rs1884725 G>A	G/G	62 (50,4%)	51 (55,4%)	2,23 (0,69-7,19)	0,17 R
		A/G	56 (45,5%)	33 (35,9%)		
		A/A	5 (4,1%)	8 (8,7%)		
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	83 (70,9%)	56 (68,3%)	0,00 (0,00-NA)	0,018 R
		A/G	29 (24,8%)	26 (31,7%)		
		A/A	5 (4,3%)	0 (0%)		
	rs1060826 G>A	G/G	34 (27,4%)	24 (26,1%)	0,66 (0,32-1,33)	0,24 R
		A/G	62 (50%)	53 (57,6%)		
		A/A	28 (22,6%)	15 (16,3%)		
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	83 (68,6%)	63 (69,2%)	0,27 (0,03-2,36)	0,18 R
		C/G	33 (27,3%)	27 (29,7%)		
		C/C	5 (4,1%)	1 (1,1%)		
	rs1064498 T>C	T/T	79 (67,5%)	56 (66,7%)	1,30 (0,18-9,50)	0,8 R
		C/T	36 (30,8%)	26 (30,9%)		
		C/C	2 (1,7%)	2 (2,4%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante. A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

Tabla 8: Asociaciones de los 14 SNPs con el Estadio en la población global (N=219). Resultados del análisis univariado ajustado por edad y sexo.

Gen	SNP ref.	Genotipo	Estadio I-III N (%)	Estadio IV N (%)	OR(95%CI)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	30 (28,9%)	33 (33,3%)	0,67 (0,33-1,36)	0,26 R
		C/T	50 (48,1%)	50 (50,5%)		
		C/C	24 (23,1%)	16 (16,2%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	86 (78,2%)	83 (80,6%)	0,79 (0,40-1,55)	0,49 D*
		C/T	24 (21,8%)	20 (19,4%)		
		T/T	0 (0%)	0 (0%)		
	rs2075939 C>T	C/C	65 (59,6%)	86 (82,7%)	<b>0,31</b> <b>(0,17-0,58)</b>	<b>0,0001</b> <b>A</b>
		C/T	40 (36,7%)	18 (17,3%)		
NOX3	rs12195525 G>T	T/T	4 (3,7%)	0 (0%)	NA (0,00-NA)	0,086 R
		G/G	83 (76,2%)	82 (79,6%)		
		G/T	26 (23,9%)	19 (18,4%)		
	rs231954 T>C	T/T	0 (0%)	2 (1,9%)	1,31 (0,75-2,30)	0,34 OD
		C/T	41 (39,4%)	34 (35%)		
		C/C	43 (41,4%)	47 (48,5%)		
	rs34960420 G>A	C/C	20 (19,2%)	16 (16,5%)	NA (0,00-NA)	0,086 R
		G/G	84 (77,1%)	83 (80,6%)		
		A/G	25 (22,9%)	18 (17,5%)		
NOX5	rs2277552 C>T	A/A	0 (0%)	2 (1,9%)	1,35 (0,39-4,62)	0,64 D*
		C/C	100 (95,2%)	93 (93,9%)		
		C/T	5 (4,8%)	6 (6,1%)		
	rs12907196 T>C	T/T	0 (0%)	0 (0%)	1,75 (0,92-3,31)	0,085 R
		C/T	38 (34,2%)	29 (28,4%)		
		C/C	51 (46%)	43 (42,2%)		
XDH	rs17011368 T>C	C/C	22 (19,8%)	30 (29,4%)	1,49 (0,68-3,23)	0,32 D*
		C/T	97 (87,4%)	87 (83,7%)		
		T/T	14 (12,6%)	17 (16,4%)		
	rs1884725 G>A	C/C	0 (0%)	0 (0%)	0,74 (0,43-1,27)	0,28 D
		G/G	55 (49,1%)	58 (56,3%)		
		A/G	50 (44,6%)	39 (37,9%)		
NOS2	rs2297518 G>A	A/A	7 (6,2%)	6 (5,8%)	1,62 (0,86-3,05)	0,13 OD
		G/G	78 (74,3%)	61 (64,9%)		
		A/G	24 (22,9%)	31 (33%)		
	rs1060826 G>A	A/A	3 (2,9%)	2 (2,1%)	1,23 (0,71-2,11)	0,46 OD
		G/G	32 (28,3%)	26 (25,2%)		
		A/G	57 (50,4%)	58 (56,3%)		
RAC2	rs2239774 G>C	A/A	24 (21,2%)	19 (18,4%)	0,17 (0,02-1,50)	0,063 R
		G/G	76 (68,5%)	70 (69,3%)		
		C/G	30 (27%)	30 (29,7%)		
	rs1064498 T>C	C/C	5 (4,5%)	1 (1%)	3,50 (0,35-34,66)	0,25 R
		T/T	71 (67%)	64 (67,4%)		
		C/T	34 (32,1%)	28 (29,5%)		
		C/C	1 (0,9%)	3 (3,2%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante.  
A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

Tabla 9: asociaciones de los 14 SNPs con la pérdida de peso en la población global (N=219).  
Resultados del análisis univariado ajustado para edad y sexo.

Gen	SNP ref.	Genotipo	Pérdida de peso No N (%)	Pérdida de peso Si N (%)	OR (IC 95%)	P Modelo	
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	37 (32,5%)	25 (29,8%)	1,17 (0,63-2,16)	0,63	
		C/T	55 (48,2%)	42 (50%)			
		C/C	22 (19,3%)	17 (20,2%)			
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	93 (77,5%)	72 (81,8%)	0,85 (0,42-1,71)	0,64 D*	
		C/T	27 (22,5%)	16 (18,2%)			
		T/T	0	0			
	rs2075939 C>T	C/C	84 (70%)	62 (70,5%)	1,40 (0,19-10,28)	0,74 R	
		C/T	34 (28,3%)	24 (27,3%)			
		T/T	2 (1,7%)	2 (2,3%)			
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	92 (76,7%)	70 (80,5%)	0,77 (0,38-1,52)	0,44 D*	
		G/T	26 (21,7%)	17 (19,5%)			
		T/T	2 (1,7%)	0 (0%)			
	rs231954 T>C	T/T	39 (34,5%)	34 (41%)	0,83 (0,46-1,51)	0,54 D	
		C/T	53 (46,9%)	35 (42,2%)			
		C/C	21 (18,6%)	14 (16,9%)			
	rs34960420 G>A	G/G	94 (79%)	70 (79,5%)	0,93 (0,47-1,86)	0,84 D*	
		A/G	23 (19,3%)	18 (20,4%)			
		A/A	2 (1,7%)	0 (0%)			
	NOX5	rs2277552 C>T	C/C	106 (92,2%)	82 (97,6%)	0,25 (0,05-1,21)	0,054
			C/T	9 (7,8%)	2 (2,4%)		
			T/T	0	0		
rs12907196 T>C		T/T	41 (33,6%)	24 (27,6%)	1,39 (0,75-2,55)	0,29 D	
		C/T	51 (41,8%)	41 (47,1%)			
		C/C	30 (24,6%)	22 (25,3%)			
XDH	rs17011368 T>C	T/T	103 (84,4%)	76 (86,4%)	0,77 (0,35-1,71)	0,52 D*	
		C/T	19 (15,6%)	12 (13,6%)			
		C/C	0	0			
	rs1884725 G>A	G/G	60 (48,4%)	52 (59,8%)	0,60 (0,37-0,97)	0,035 A	
		A/G	54 (43,5%)	33 (37,9%)			
		A/A	10 (8,1%)	2 (2,3%)			
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	78 (69%)	59 (72%)	0,89 (0,46-1,70)	0,72 OD	
		A/G	32 (28,3%)	21 (25,6%)			
		A/A	3 (2,6%)	2 (2,4%)			
	rs1060826 G>A	G/G	34 (27,4%)	22 (25,3%)	1,16 (0,66-2,02)	0,6 OD	
		A/G	65 (52,4%)	48 (55,2%)			
		A/A	25 (20,2%)	17 (19,5%)			
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	81 (66,4%)	62 (72,1%)	0,00 (0,00-NA)	0,016 R	
		C/G	35 (28,7%)	24 (27,9%)			
		C/C	6 (4,9%)	0 (0%)			
	rs1064498 T>C	T/T	75 (65,2%)	56 (68,3%)	0,83 (0,45-1,55)	0,57 OD	
		C/T	38 (33%)	24 (29,3%)			
		C/C	2 (1,7%)	2 (2,4%)			

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante. A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

### 5.4.2. Población con cáncer de pulmón no microcítico:

En la población de CNMP de 180 pacientes se evaluó también la asociación de los 14 SNPs seleccionados con los factores pronósticos clínicos en cáncer de pulmón: el ECOG, la pérdida de peso y el estadio. Al igual que en el caso anterior se testaron los 5 modelos genéticos descritos previamente y con el mismo tipo de codificación para las variables. El análisis se ajustó para el sexo y la edad. Los resultados son análogos a los obtenidos en la población global. Se resumen a continuación:

ECOG: Al igual que en la población global, se observó una asociación marginal con el SNP *NCF4* rs2075939 (OR: 0,46; IC 95% OR: 0,23-0,90; p=0,019; modelo aditivo). Los pacientes portadores del alelo menor T presentaron un riesgo menor de presentar un ECOG 2-4. Según el modelo aditivo utilizado, cada copia del alelo T disminuyó en un 54 % el riesgo de presentar un ECOG entre 2-4. La tabla 10 muestra los resultados de la asociación entre el ECOG y el genotipo.

Estadio: De forma idéntica a lo descrito en la población global, se detectó una asociación estadísticamente significativa con el SNP *NCF4* rs2075939 (OR: 0,30; IC 95% OR: 0,15-0,62; p=0,0005; modelo aditivo). Los pacientes con CPNM diagnosticados en estadios I-III presentaron una mayor frecuencia del alelo menor T de *NCF4* (21%) que los pacientes en estadio IV (7,8%). Cada copia del alelo T disminuyó 3 veces el riesgo de presentar la enfermedad en estadio IV. La tabla 11 muestra los resultados de la asociación entre el estadio y el genotipo.

Pérdida de peso: No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre esta variable y ninguno de los SNPs analizados en la población con CPNM. Los resultados de este análisis se describen en la tabla 12.

Tabla 10: Asociaciones de los 14 SNPs con el ECOG en la población con cáncer de pulmón no microcítico (N=180). Resultados del análisis univariado ajustado por edad y sexo.

Gen	SNP ref,	Genotipo	ECOG 0-1 N (%)	ECOG 2-4 N (%)	OR(95%CI)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	24 (26,1%)	27 (35,5%)	0,66 (0,36-1,22)	0,18 OD
		C/T	51 (55,4%)	34 (44,7%)		
		C/C	17 (18,5%)	15 (19,7%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	73 (74,5%)	63 (81,8%)	0,65 (0,31-1,38)	0,26 D
		C/T	25 (25,5%)	14 (18,2%)		
		T/T	0 (0%)	0 (0%)		
	rs2075939 C>T	C/C	64 (66%)	61 (79,2%)	<b>0,46</b> <b>(0,23-0,90)</b>	<b>0,019</b> <b>A</b>
		C/T	31 (32%)	16 (20,8%)		
		T/T	2 (2,1%)	0 (0%)		
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	75 (77,3%)	64 (83,1%)	0,61 (0,30-1,25)	0,17 A
		G/T	20 (20,6%)	13 (16,9%)		
		T/T	2 (2,1%)	0 (0%)		
	rs231954 T>C	T/T	34 (36,2%)	30 (42,9%)	0,79 (0,41-1,50)	0,46 D
		C/T	43 (45,7%)	28 (40%)		
		C/C	17 (18,1%)	12 (17,1%)		
	rs34960420 G>A	G/G	75 (77,3%)	66 (84,6%)	0,55 (0,26-1,16)	0,11 A
		A/G	20 (20,6%)	12 (15,4%)		
		A/A	2 (2,1%)	0 (0%)		
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	88 (94,6%)	72 (96%)	0,65 (0,15-2,85)	0,56 D
		C/T	5 (5,4%)	3 (4%)		
		T/T	0 (0%)	0 (0%)		
	rs12907196 T>C	T/T	29 (29,6%)	26 (33,8%)	0,82 (0,43-1,56)	0,54 D
		C/T	45 (45,9%)	33 (42,9%)		
		C/C	24 (24,5%)	18 (23,4%)		
XDH	rs17011368 T>C	T/T	87 (88,8%)	61 (78,2%)	2,12 (0,92-4,90)	0,074 D*
		C/T	11 (11,2%)	17 (21,8%)		
		C/C	0	0		
	rs1884725 G>A	G/G	45 (45,5%)	42 (54,5%)	0,56 (0,30-1,03)	0,059 OD
		A/G	51 (51,5%)	28 (36,4%)		
		A/A	3 (3%)	7 (9,1%)		
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	71 (75,5%)	45 (65,2%)	2,07 (1,02-4,21)	0,044 OD
		A/G	20 (21,3%)	24 (34,8%)		
		A/A	3 (3,2%)	0 (0%)		
	rs1060826 G>A	G/G	28 (28%)	23 (29,9%)	0,58 (0,27-1,27)	0,17 R
		A/G	48 (48%)	42 (54,5%)		
		A/A	24 (24%)	12 (15,6%)		
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	67 (69,1%)	53 (69,7%)	0,30 (0,03-2,75)	0,24 R
		C/G	26 (26,8%)	22 (28,9%)		
		C/C	4 (4,1%)	1 (1,3%)		
	rs1064498 T>C	T/T	63 (67%)	45 (64,3%)	1,24 (0,17-9,08)	0,83 R
		C/T	29 (30,9%)	23 (32,9%)		
		C/C	2 (2,1%)	2 (2,9%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante.  
A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

Marginalmente significativo  
Estadísticamente significativo

Tabla 11 asociaciones de los 14 SNPs con el Estadio en la población con cáncer de pulmón no microcítico (N= 180). Resultados del análisis univariado ajustado por edad y sexo.

Gen	SNP ref,	Genotype	Estadio I-III N (%)	Estadio IV N (%)	OR(95%CI)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	24 (27,9%)	27 (32,9%)	0,80 (0,41-1,55)	0,51 D
		C/T	44 (51,2%)	41 (50%)		
		C/C	18 (20,9%)	14 (17,1%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	72 (78,3%)	64 (77,1%)	0,94 (0,45-1,96)	0,87 D*
		C/T	20 (21,7%)	19 (22,9%)		
		T/T	0	0		
	rs2075939 C>T	C/C	55 (60,4%)	70 (84,3%)	<b>0,30</b> <b>(0,15-0,62)</b>	<b>0,0005</b> <b>A</b>
		C/T	34 (37,4%)	13 (15,7%)		
	T/T	2 (2,2%)	0 (0%)			
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	73 (79,3%)	66 (80,5%)	NA (0,00-NA)	0,077 R
		G/T	19 (20,6%)	14 (17,1%)		
		T/T	0 (0%)	2 (2,4%)		
	rs231954 T>C	T/T	37 (43%)	27 (34,6%)	1,89 (1,00-3,57)	0,047 OD
		C/T	31 (36%)	40 (51,3%)		
		C/C	18 (20,9%)	11 (14,1%)		
	rs34960420 G>A	G/G	74 (80,4%)	67 (80,7%)	NA (0,00-NA)	0,079 R
		A/G	18 (19,6%)	14 (16,9%)		
		A/A	0 (0%)	2 (2,4%)		
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	83 (95,4%)	77 (95,1%)	1,24 (0,29-5,26)	0,77 D*
		C/T	4 (4,6%)	4 (4,9%)		
		T/T	0	0		
	rs12907196 T>C	T/T	32 (34%)	23 (28,4%)	1,68 (0,82-3,44)	0,15 R
		C/T	43 (45,7%)	35 (43,2%)		
		C/C	19 (20,2%)	23 (28,4%)		
XDH	rs17011368 T>C	T/T	81 (87,1%)	67 (80,7%)	1,83 (0,79-4,23)	0,15 D
		C/T	12 (12,9%)	16 (19,3%)		
		C/C	0	0		
	rs1884725 G>A	G/G	44 (46,8%)	43 (52,4%)	0,79 (0,43-1,44)	0,44 D
		A/G	44 (46,8%)	35 (42,7%)		
		A/A	6 (6,4%)	4 (4,9%)		
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	68 (77,3%)	48 (64%)	2,04 (1,00-4,14)	0,048 OD
		A/G	18 (20,4%)	26 (34,7%)		
		A/A	2 (2,3%)	1 (1,3%)		
	rs1060826 G>A	G/G	26 (27,4%)	25 (30,5%)	0,88 (0,57-1,36)	0,57 A
		A/G	48 (50,5%)	42 (51,2%)		
		A/A	21 (22,1%)	15 (18,3%)		
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	65 (69,9%)	55 (68,8%)	0,23 (0,02-2,12)	0,15 R
		C/G	24 (25,8%)	24 (30%)		
		C/C	4 (4,3%)	1 (1,2%)		
	rs1064498 T>C	T/T	59 (66,3%)	49 (65,3%)	3,84 (0,38-38,53)	0,22 R
		C/T	29 (32,6%)	23 (30,7%)		
		C/C	1 (1,1%)	3 (4%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante. A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

Tabla 12: asociación de los 14 SNPs con la pérdida de peso en la población con cáncer de pulmón no microcítico (N=180). Resultados del análisis univariado ajustado por edad y sexo.

Gen	SNP ref.	Genotipo	Pérdida de peso No N (%)	Pérdida de peso Si N (%)	OR (95% IC)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	29 (31,2%)	21 (29,2%)	1,25 (0,67-2,32)	0,49 OD
		C/T	45 (48,4%)	38 (52,8%)		
		C/C	19 (20,4%)	13 (18,1%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	74 (74,8%)	60 (82,2%)	0,68 (0,32-1,48)	0,33 D*
		C/T	25 (25,2%)	13 (17,8%)		
		0	0			
	rs2075939 C>T	C/C	72 (73,5%)	50 (68,5%)	1,18 (0,60-2,32)	0,64D*
		C/T	26 (26,5%)	21 (28,8%)		
T/T		0 (0%)	2 (2,7%)			
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	77 (77,8%)	60 (83,3%)	0,66 (0,30-1,46)	0,30 D*
		G/T	20 (20,2%)	12 (16,7%)		
		T/T	2 (2%)	0 (0%)		
	rs231954 T>C	T/T	34 (37,4%)	29 (41,4%)	0,88 (0,46-1,66)	0,68 OD
		C/T	40 (44%)	29 (41,4%)		
		C/C	17 (18,7%)	12 (17,1%)		
	rs34960420 G>A	G/G	79 (79,8%)	60 (82,2%)	0,81 (0,37-1,78)	0,61 D*
		A/G	18 (18,2%)	13 (17,8%)		
		A/A	2 (2%)	0 (0%)		
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	88 (93,6%)	69 (97,2%)	0,36 (0,07-1,87)	0,19 D*
		C/T	6 (6,4%)	2 (2,8%)		
		0	0			
	rs12907196 T>C	T/T	34 (33,7%)	21 (29,2%)	1,40 (0,75-2,61)	0,29 OD
		C/T	41 (40,6%)	35 (48,6%)		
C/C		26 (25,7%)	16 (22,2%)			
XDH	rs17011368 T>C	T/T	83 (83%)	62 (84,9%)	0,80 (0,34-1,86)	0,6 D*
		C/T	17 (17%)	11 (15,1%)		
		C/C	0	0		
	rs1884725 G>A	G/G	47 (46,1%)	40 (55,6%)	0,30 (0,06-1,50)	0,11 R
		A/G	47 (46,1%)	30 (41,7%)		
		A/A	8 (7,8%)	2 (2,8%)		
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	67 (71,3%)	48 (71,6%)	2,69 (0,24-30,47)	0,97 D
		A/G	26 (27,7%)	17 (25,4%)		
		A/A	1 (1,1%)	2 (3%)		
	rs1060826 G>A	G/G	28 (27,4%)	21 (29,2%)	0,88 (0,48-1,63)	0,69 OD
		A/G	54 (52,9%)	36 (50%)		
		A/A	20 (19,6%)	15 (20,8%)		
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	67 (67%)	51 (71,8%)	0,00 (0,00-NA)	0,02 R
		C/G	28 (28%)	20 (28,2%)		
		C/C	5 (5%)	0 (0%)		
	rs1064498 T>C	T/T	62 (65,3%)	44 (65,7%)	1,39 (0,19-10,21)	0,75 R
		C/T	31 (32,6%)	21 (31,3%)		
		C/C	2 (2,1%)	2 (3%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor sólo se ha evaluado el modelo dominante. A: aditivo, R: recesivo, D: dominante, OD: sobredominante.

## **5.5. Relación de los polimorfismos con la respuesta al tratamiento de combinaciones de quimioterapia basadas en platino**

Dado que la quimioterapia estándar en el cáncer de pulmón son los dobletes de platino (combinaciones de quimioterapia que incluyen cisplatino o carboplatino asociados a otros fármacos), hemos considerado relevante valorar la respuesta en este tipo de combinaciones. Por otra parte, sólo 5 pacientes del total de la población recibieron quimioterapia que no contenía platino y han quedado excluidos del análisis para la respuesta

### **5.5.1. Población global**

Un total de 142 pacientes de los 219 pacientes de la población global recibieron quimioterapia. Un 96,5% (137 pacientes) recibió quimioterapia basada en combinaciones de platino. Se pudo evaluar la respuesta en 110 pacientes que recibieron quimioterapia basada en platino. De estos pacientes evaluables, 65 (59,0 %) alcanzaron criterios de RC o RP, 23 pacientes (21,0%) se valoraron como EE y 22 pacientes (20,0%) presentaron PE como mejor respuesta al tratamiento.

La tabla 13 muestra las características de estos 110 pacientes de la población global en los que se pudo evaluar la respuesta a combinaciones de platino. Un 77,3% de los pacientes presentaban ECOG 0-1 y un 25,5% correspondieron a pacientes con diagnóstico de carcinoma microcítico.

Tabla 13: Características de los pacientes evaluados para la respuesta tras combinaciones de platino en la población global (N=110).

Característica	N	%
Edad (años)		
<65	47	42,7
65-74	45	40,9
≥75	18	16,4
ECOG		
0	18	16,4
1	67	60,9
2	24	21,8
3	1	0,9
Pérdida de peso (v.p.=2)		
No	70	64,8
<10%	22	20,4
>10%	16	14,8
Tipo histológico		
No microcítico	82	74,5
Microcítico	28	25,5
Estadio		
I-II	17	15,5
III	44	40,0
IV	49	44,5
NOX3 (rs231654) (v.p.=7)		
TT+TC	85	82,5
CC	18	17,5
Respuesta al tratamiento		
RC/RP	65	59,1
EE	23	20,9
PE	22	20,0
v.p.: valores perdidos		

Para evaluar el tipo de respuesta y su asociación con los polimorfismos seleccionados, se crearon dos categorías: bajo el término “respuesta” se agruparon la RC, RP y EE y se comparó frente a la categoría “no respuesta”, que incluyó la PE. Se evaluaron los 5 modelos genéticos descritos previamente.

La Tabla 14 muestra el test de asociación de los 14 SNPs con la respuesta a la quimioterapia basada en platino en la población global.

El SNP *NOX3* rs231954 (T>C) presentó una asociación estadísticamente significativa con la respuesta, de acuerdo con un modelo de herencia recesivo. Los pacientes que no respondieron a la quimioterapia basada en platino presentaron una mayor frecuencia del alelo menor C de *NOX3* (61,9%) que aquellos que respondieron a la quimioterapia (37,2%). Esto significa que los pacientes portadores del alelo menor C en homocigosis (genotipo CC) tienen un riesgo más alto (hasta de 6 veces) de no responder al tratamiento, comparado con el resto de pacientes (aquellos con genotipos TT y TC) (OR: 6,08; IC 95% OR: 2,01-18,41;  $p=0,0015$ ).

Análogamente, el SNP *NOS2* rs1060826 (G>A) también se asoció (marginalmente) con la respuesta, de acuerdo con un modelo recesivo. Los pacientes portadores del alelo menor A en homocigosis (genotipo AA) tienen un riesgo más alto (casi de 5 veces) de no responder al tratamiento, comparado con el resto de pacientes (aquellos con genotipos GG y GA). (OR: 4,85; IC 95% OR: 1,68-13,97;  $p=0,0041$ ).

Tabla 14: Asociación de los polimorfismos con la respuesta a la quimioterapia basada en platino en la población global (N=110)

Gen	SNP ref.	Genotipo	Respuesta (RC/RP/EE) N (%)	No Respuesta (PE) N (%)	OR (IC 95%)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	27 (32,5%)	6 (28,6%)	1,54 (0,48-4,90)	0,47 R
		C/T	42 (50,6%)	10 (47,6%)		
		C/C	14 (16,9%)	5 (23,8%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	68 (79,1%)	19 (86,4%)	0,60 (0,16-2,24)	0,43 D
		C/T	18 (20,9%)	3 (13,6%)		
		T/T	0	0		
	rs2075939 C>T	C/C	64 (73,6%)	15 (68,2%)	0,00 (0,00-NA)	0,17 R
		C/T	19 (21,8%)	7 (31,8%)		
T/T		4 (4,6%)	0 (0%)			
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	68 (79,1%)	19 (86,4%)	0,59 (0,16-2,09)	0,38 A
		G/T	17 (19,8%)	3 (13,6%)		
		T/T	1 (1,2%)	0 (0%)		
	rs231954 T>C	T/T	30 (36,6%)	4 (19,1%)	<b>6,08</b> <b>(2,01-18,41)</b>	<b>0,0015</b> <b>R</b>
		C/T	43 (52,4%)	8 (38,1%)		
		C/C	9 (11%)	9 (42,9%)		
	rs34960420 G>A	G/G	68 (81%)	19 (86,4%)	0,65 (0,18-2,33)	0,49 A
		A/G	15 (17,9%)	3 (13,6%)		
A/A		1 (1,2%)	0 (0%)			
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	81 (96,4%)	20 (95,2%)	1,35 (0,13-13,68)	0,8 D*
		C/T	3 (3,6%)	1 (4,8%)		
		T/T	0(0%)	0(0%)		
	rs12907196 T>C	T/T	26 (30,2%)	9 (40,9%)	0,63 (0,24-1,65)	0,35 D
		C/T	40 (46,5%)	9 (40,9%)		
		C/C	20 (23,3%)	4 (18,2%)		
XDH	rs17011368 T>C	T/T	78 (89,7%)	17 (77,3%)	2,55 (0,76-8,57)	0,14 D*
		C/T	9 (10,3%)	5 (22,7%)		
		C/C	0(0%)	0(0%)		
	rs1884725 G>A	G/G	48 (55,2%)	10 (45,5%)	1,48 (0,58-3,78)	0,41
		A/G	35 (40,2%)	11 (50%)		
A/A		4 (4,6%)	1 (4,5%)			
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	56 (70%)	15 (75%)	0,00 (0,00-NA)	0,24 R
		A/G	21 (26,2%)	5 (25%)		
		A/A	3 (3,8%)	0 (0%)		
	rs1060826 G>A	G/G	26 (29,6%)	5 (22,7%)	<b>4,85</b> <b>(1,68-13,97)</b>	<b>0,0041</b> <b>R</b>
		A/G	51 (58%)	8 (36,4%)		
A/A		11 (12,5%)	9 (40,9%)			
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	59 (68,6%)	18 (81,8%)	0,49 (0,15-1,57)	0,21 D
		C/G	24 (27,9%)	4 (18,2%)		
		C/C	3 (3,5%)	0 (0%)		
	rs1064498 T>C	T/T	60 (74,1%)	16 (80%)	0,71 (0,21-2,38)	0,58 D*
		C/T	20 (24,7%)	4 (20%)		
		C/C	1 (1,2%)	0 (0%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante. A: aditivo, R: recesivo, D: dominante, OD: sobredominante

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

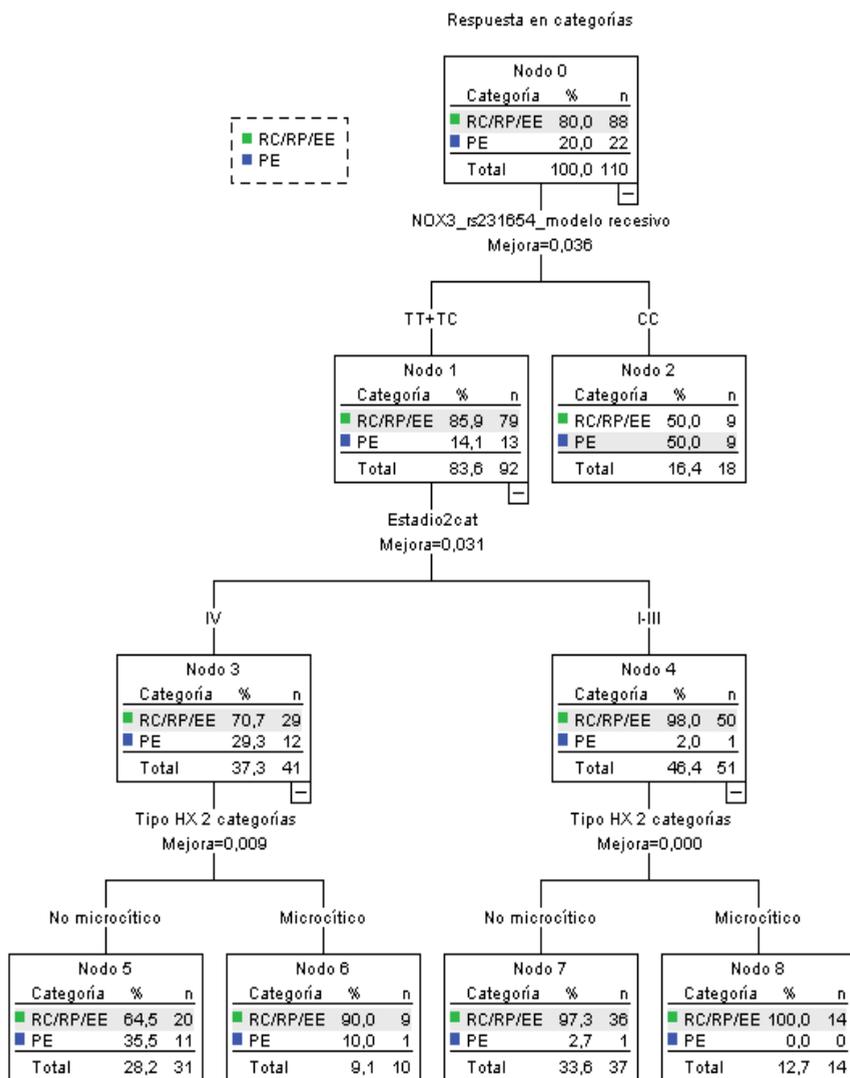
Mediante regresión logística, se cuantificó el grado de asociación entre el SNP *NOX3* rs231954 con la modalidad de respuesta “progresión de enfermedad (PE)” al tratamiento. Se constató que este SNP en homocigosis aumentaba 14,41 veces el riesgo de presentar como respuesta al tratamiento una PE (OR: 14,41; 95%CI OR: 3,05-68,01; p=0,001) tras el ajuste con el resto de co-variables seleccionadas. De estas últimas, sólo el estadio presentó un OR ajustado asociado a la respuesta estadísticamente significativo (OR: 9,21; 95%CI OR: 1,97-43,09; p=0,005). La tabla 15 muestra los detalles del análisis de regresión logística para evaluar la relación con la respuesta en la población global (Tabla 15).

*Tabla 15: Análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre las variables estudiadas y la progresión tras el tratamiento con quimioterapia basada en platino en la población global (PE vs. RC/RP/EE).*

Característica	OR crudo	IC 95% OR	P	OR ajustado	IC 95% OR	P
Edad (años)			0,554			0,689
<65	1	1		1	1	
65-74	0,82	0,30-2,21	0,693	1,41	0,39-5,13	0,602
≥75	0,41	0,08-2,06	0,279	0,60	0,07-4,82	0,629
ECOG			0,094			0,757
0-1	1	1		1	1	
2-3	2,39	0,86-6,60		1,28	0,27-6,16	
Pérdida de peso			0,188			0,539
No	1	1		1	1	
Sí	1,92	0,73-5,04		1,51	0,41-5,56	
Tipo histológico			0,065			0,072
No microcítico	1	1		1	1	
Microcítico	0,24	0,05-1,10		0,12	0,01-1,21	
Estadio			0,001			0,005
I-III	1	1		1	1	
IV	5,95	2,01-17,66		9,21	1,97-43,09	
<b>NOX3 (rs231654)</b>			<b>0,001</b>			<b>0,001</b>
TT+TC	1	1		1	1	
CC	<b>6,08</b>	<b>2,01-18,41</b>		<b>14,41</b>	<b>3,05-68,01</b>	

Se completó el análisis de la relación entre la respuesta y el resto de variables en la población global mediante la metodología CART. Este método nos permitió construir un árbol de decisión cuyos resultados evaluados son concordantes con los resultados obtenidos en la regresión logística. El primer nodo del árbol establece el parámetro que más se asocia a la ausencia de respuesta a la quimioterapia. En nuestro caso, es la presencia del polimorfismo *NOX3* (rs231654). La presencia del alelo C en homocigosis condiciona que un 50% de pacientes presenten PE frente a un 14% de pacientes con el alelo consenso o el polimorfismo en heterocigosis. En el grupo de pacientes que no presentan el alelo C en homocigosis, el estadio es la variable que mejor determina la respuesta. En este grupo, progresan un 30% con estadios IV frente a un 2% con estadios I-III. La figura 15 muestra el árbol de decisión tras aplicar la herramienta CART en la población global.

Figura 15: árbol de decisión tras aplicar la herramienta CART para valorar la asociación de la respuesta a esquemas con platino con las variables estudiadas en la población global (N=110)



### **5.5.2. Población con cáncer de pulmón no microcítico**

Un total de 108 pacientes de los 180 pacientes de la población con cáncer de pulmón no microcítico recibieron quimioterapia. Un 95,4% (103 pacientes) recibió quimioterapia basada en combinaciones de platino. Se pudo evaluar la respuesta en 82 pacientes que recibieron quimioterapia basada en platino. De estos pacientes evaluables, 40 (48,7%) alcanzaron criterios de RC o RP, 22 pacientes (26,8%) se valoraron como EE y 20 pacientes (24,4%) presentaron PE como mejor respuesta al tratamiento.

La tabla 16 muestra las características de estos 82 pacientes de la población con cáncer de pulmón no microcítico en los que se pudo evaluar la respuesta a combinaciones de platino. Un 76,9% de los pacientes presentaban ECOG 0-1, un 62,2% de los pacientes presentaron histología de tumor epidermoide y un 25,6 % histología de adenocarcinoma. Un 20,7% de los pacientes fueron tratados con estadios iniciales I-II.

Tabla 16: Características de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico evaluados para la respuesta tras combinaciones de platino (N=82).

<b>Característica</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Edad (años)		
<65	35	42,7
65-74	30	36,6
≥75	17	20,7
ECOG		
0	14	17,1
1	49	59,8
2	18	22,0
3	1	1,2
Pérdida de peso (v,p,=1)		
No	50	61,7
<10%	16	19,8
>10%	15	18,5
Tipo histológico		
Epidermoide	51	62,2
Adenocarcinoma	21	25,6
Otros	10	12,2
Estadio		
I-II	17	20,7
III	28	34,1
IV	37	45,1
NOX3 (rs231654) (v,p,=5)		
TT+TC	63	81,8
CC	14	18,2
Respuesta al tratamiento		
RC/RP	40	48,8
EE	22	26,8
PE	20	24,4
v.p.: valores perdidos		

Para evaluar la relación entre la respuesta y los polimorfismos analizados en la población con CPNM se siguió la misma metodología que para la población global.

El SNP *NOX3* rs231954 (T>C) presentó una asociación estadísticamente significativa con la respuesta, de acuerdo con un modelo de herencia recesivo. Los pacientes que no respondieron a la quimioterapia basada en platino presentaron una mayor frecuencia del alelo menor C de *NOX3* (60%) que aquellos que respondieron a la quimioterapia (35%) (OR: 5,67; IC 95% OR: 1,65-19,41;  $p=0,00031$ ).

Análogamente, el SNP *NOS2* rs1060826 (G>A) también se asoció (marginamente) con la respuesta, de acuerdo con un modelo recesivo. Los pacientes portadores del alelo menor A en homocigosis (genotipo AA) exhibieron un riesgo 5 veces más alto de no responder al tratamiento, comparado con el resto de pacientes (aquellos con genotipos GG y GA); (OR: 5,39; IC 95% OR: 1,54-18,83;  $p=0,008$ ).

La Tabla 17 muestra las asociaciones de los 14 SNPs con la respuesta a la quimioterapia basada en platino en la población con cáncer de pulmón no microcítico.

Tabla 17: Asociación de los polimorfismos con la respuesta a la quimioterapia basada en platino en la población de cáncer de pulmón no microcítico (N=82)

Gen	SNP ref.	Genotipo	Respuesta (RC/RP/EE) N (%)	No Respuesta (PE) N (%)	OR (IC 95%)	P Modelo
NCF2	rs2274064 T>C	T/T	20 (33,9%)	6 (30%)	1,30 (0,35-4,84)	0,7 R
		C/T	28 (47,5%)	10 (50%)		
		C/C	11 (18,6%)	4 (20%)		
NCF4	rs2072712 C>T	C/C	48 (78,7%)	17 (85%)	0,58 (0,14-2,41)	0,44 D*
		C/T	13 (21,3%)	3 (15%)		
		T/T	0(0%)	0		
	rs2075939 C>T	C/C	48 (78,7%)	15 (75%)	1,18 (0,35-3,97)	0,79 D*
		C/T	11 (18%)	5 (25%)		
T/T		2 (3,3%)	0 (0%)			
NOX3	rs12195525 G>T	G/G	51 (83,6%)	18 (90%)	0,70 (0,13-3,64)	0,66 D*
		G/T	9 (14,8%)	2 (10%)		
		T/T	1 (1,6%)	0 (0%)		
	rs231954 T>C	T/T	23 (40,4%)	4 (20%)	<b>5,67</b> <b>(1,65-19,41)</b>	0,0031 R
		C/T	28 (49,1%)	8 (40%)		
		C/C	6 (10,5%)	8 (40%)		
	rs34960420 G>A	G/G	51 (85%)	18 (90%)	0,77 (0,15-4,09)	0,76 D*
		A/G	8 (13,3%)	2 (10%)		
		A/A	1 (1,7%)	0 (0%)		
NOX5	rs2277552 C>T	C/C	59 (98,3%)	19 (95%)	3,64 (0,21-63,15)	0,39 D*
		C/T	1 (1,7%)	1 (5%)		
		T/T	0	0		
	rs12907196 T>C	T/T	18 (29,5%)	8 (40%)	0,51 (0,13-2,05)	0,33 R*
		C/T	27 (44,3%)	9 (45%)		
		C/C	16 (26,2%)	3 (15%)		
XDH	rs17011368 T>C	T/T	55 (90,2%)	15 (75%)	3,13 (0,80-12,19)	0,11 D*
		C/T	6 (9,8%)	5 (25%)		
		C/C	0	0		
	rs1884725 G>A	G/G	32 (52,5%)	8 (40%)	1,52 (0,58-4,00)	0,44 A
		A/G	28 (45,9%)	11 (55%)		
A/A		1 (1,6%)	1 (5%)			
NOS2	rs2297518 G>A	G/G	44 (77,2%)	13 (72,2%)	1,22 (0,35-4,23)	0,75 D*
		A/G	12 (21,1%)	5 (27,8%)		
		A/A	1 (1,8%)	0 (0%)		
	rs1060826 G>A	G/G	20 (32,3%)	5 (25%)	5,39 (1,54-18,83)	0,008 R
		A/G	35 (56,5%)	7 (35%)		
		A/A	7 (11,3%)	8 (40%)		
RAC2	rs2239774 G>C	G/G	41 (68,3%)	17 (85%)	0,36 (0,09-1,41)	0,012 D*
		C/G	17 (28,3%)	3 (15%)		
		C/C	2 (3,3%)	0 (0%)		
	rs1064498 T>C	T/T	42 (73,7%)	15 (83,3%)	0,62 (0,15-2,52)	0,49 D*
		C/T	14 (24,6%)	3 (16,7%)		
		C/C	1 (1,8%)	0 (0%)		

\*En los polimorfismos en los que no hay individuos homocigotos para el alelo menor solo se ha evaluado el modelo dominante. A:aditivo, R:recesivo, D:dominante, OD: sobredominante

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

También mediante regresión logística, se cuantificó el grado de asociación entre el SNP *NOX3* rs231954 con la “progresión” al tratamiento de quimioterapia basada en platino en la población con CPNM. Nuevamente se constató que este SNP en homocigosis aumentaba 13,19 veces el riesgo de progresar al tratamiento (OR 13,19; IC 95% OR: 2,33-74,66; p=0,0041) tras el ajuste con el resto de co-variables seleccionadas. De estas últimas, sólo el estadio presentó un OR ajustado asociado a la respuesta estadísticamente significativo (OR 11,65; IC 95% OR 2,05-66,25; p=0,006; Tabla 18).

*Tabla 18: Análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre las variables estudiadas y la progresión tras tratamiento con quimioterapia basada en platino en la población de cáncer de pulmón no microcítico (PE vs. RC/RP/EE).*

Característica	OR crudo	IC 95% OR	P	OR ajustado	IC 95% OR	P
Edad (años)			0.319			0.821
<65	1	1		1	1	
65-74	0.66	0.22-2.01	0.468	1.12	0.28-4.43	0.873
≥75	0.29	0.06-1.50	0.140	0.55	0.06-5.00	0.597
ECOG			0.046			0.933
0-1	1	1		1	1	
2-3	3.09	1.02-9.35		1.08	0.20-5.94	
Pérdida de peso			0.353			0.452
No	1	1		1	1	
Sí	1.64	0.58-4.63		1.70	0.43-6.70	
Tipo histológico			0.249			0.838
Epidermoide	1	1		1	1	
Adenocarcinoma	2.52	0.82-7.73	0.105	1.54	0.36-6.58	0.559
Otros	1.03	0.19-5.59	0.977	1.32	0.13-13.21	0.814
Estadio			0.001			0.006
I-III	1	1		1	1	
IV	7.81	2.32-23.33		11.65	2.05-66.25	
<b><i>NOX3</i> (rs231654)</b>			<b>0.006</b>			<b>0.004</b>
TT+TC	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	
CC	<b>5.67</b>	<b>1.65-19.41</b>		<b>13.19</b>	<b>2.33-74.66</b>	

En la población de CPNM también se completó el análisis de la relación entre la respuesta a esquemas con platino y el resto de variables con la metodología CART. Los resultados evaluados mediante esta metodología también fueron concordantes con los resultados obtenidos en la región logística. En este caso el parámetro que apareció en el primer nodo fue el estadio. Un 43,2 % de pacientes con estadio IV presentaron como respuesta PE frente a un 8,9% en estadios I-III.

El segundo nodo estableció que la presencia del polimorfismo *NOX3* (rs231654) fue la variable asociada a una respuesta tipo PE en ambos estadios. En estadios I-III progresaron un 37,5 % de pacientes que presentan el alelo C en homocigosis frente a un 2% de pacientes que no expresaron este genotipo. En el estadio IV progresaron un 83,3% de los pacientes con el alelo en C en homocigosis frente a un 35,5% de los pacientes que no expresaron esta variable.

La figura 16 muestra el árbol de decisión tras aplicar la herramienta CART en la población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico para evaluar las variables asociadas a la respuesta a platino.

Figura 16: árbol de decisión tras aplicar la herramienta CART para valorar la asociación de la respuesta a esquemas con platino con las variables estudiadas en la población de CPNM (N=82)

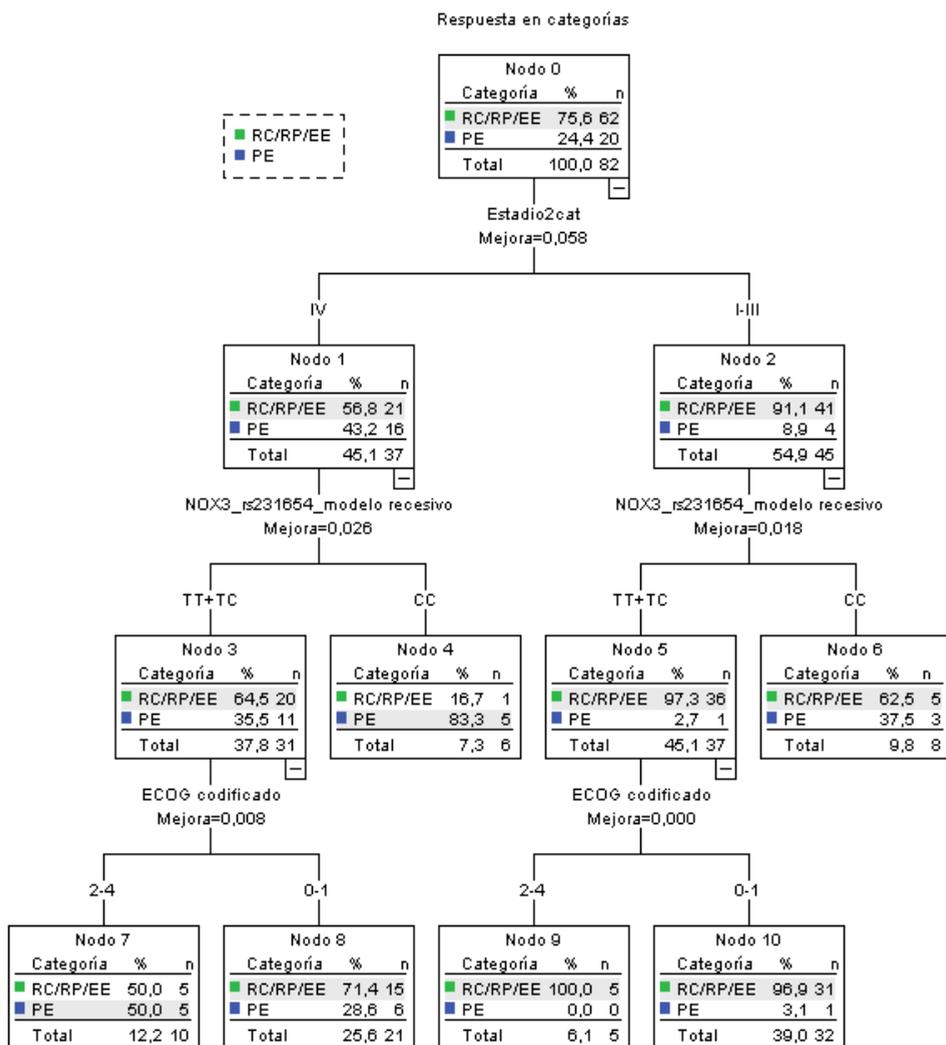


Figura 17: diagrama de barras que representa el porcentaje de respuestas a quimioterapia basada en platino en función de la presencia de *NOX3* rs231654 (modelo recesivo) en la población global (N=110)

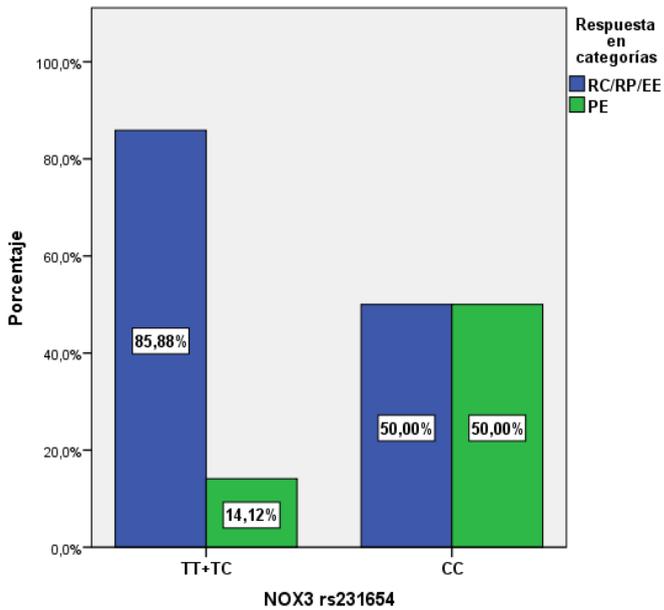
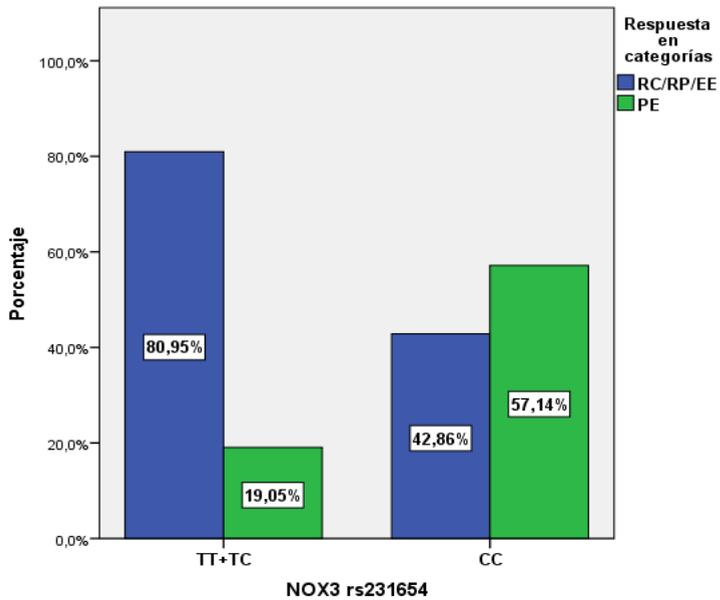


Figura 18: diagrama de barras que representa el porcentaje de respuestas a quimioterapia basada en platino en función de la presencia de *NOX3* rs231654 (modelo recesivo) en la población de cáncer de pulmón no microcítico (N=82).

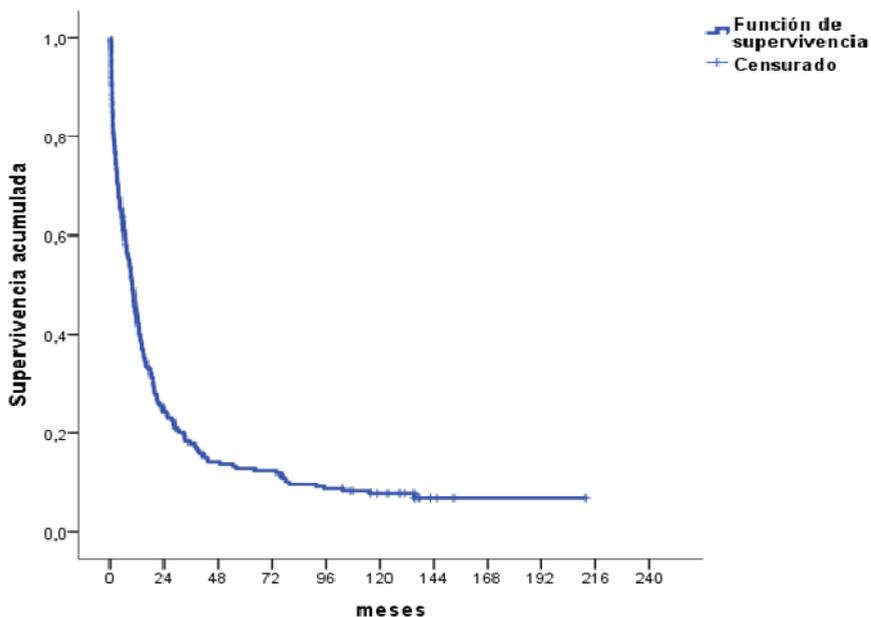


## 5.6. Resultados de supervivencia

### 5.6.1. Población global

Para el estudio de supervivencia se constató que, tras una mediana de seguimiento de 135 meses (intervalo de 103-212 meses), 203 pacientes habían fallecido. No hubo ninguna pérdida de seguimiento. La supervivencia global de los 219 pacientes estudiados fue del 43,4%, 24,2% y 12,8% al año, a los dos y a los cinco años, respectivamente, con una mediana de supervivencia de 10,2 meses. La Figura 19 muestra la curva de supervivencia de la población global

Figura 19: curva de supervivencia global de la población N=219

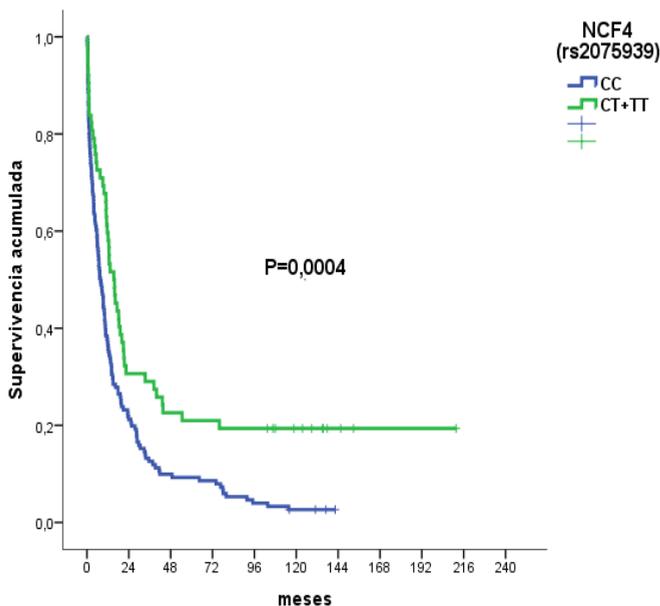


### Influencia de los polimorfismos en la supervivencia de la población global:

Se evaluó la influencia de cada uno de los polimorfismos en la supervivencia global mediante curvas de Kaplan-Meier y la prueba de los rangos logarítmicos

(Tabla 19). Se observó que sólo el SNP *NCF4* rs2075939 (C>T) presentó una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia (HR (*del inglés "hazard ratio"*): 0,56; IC 95% HR: 0,41-077;  $p=0,0005$ ) de acuerdo con un modelo dominante. La supervivencia al año, a los 2 años, a los 5 años y a los 10 años de los individuos con la variante CT o TT fue significativamente superior que la de los pacientes portadores de la variante consenso CC (Figura 20, tabla 20).

Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para la población global (N=219) en función del polimorfismo rs2075939 en *NCF4*.



Los polimorfismos rs2297518 en *NOS2* (modelo recesivo) y rs2239774 en *RAC2* (modelo aditivo) presentaron una asociación marginalmente significativa con la supervivencia (Tabla 19).

Tabla 19: Análisis univariado de la asociación de los polimorfismos con la supervivencia de la población global (N=219).

Gen	SNP ref.	Genotipo	Mod.	HR (IC 95%)	P (Cox)
NCF2	rs2274064 T>C	TT vs. CT+CC	D	1,11 (0,82-1,52)	0,50
		TT+CT vs. CC	R	1,22 (0,86-1,74)	0,26
			A	1,12 (0,91-1,37)	0,28
NCF4	rs2072712 C>T	CC vs. CT+TT	D	0,67 (0,47-0,96)	0,03
		CC+CT vs. TT	R	NC	
			A	NC	
	rs2075939 C>T	CC vs. CT+TT	<b>D</b>	<b>0,56 (0,41-0,77)</b>	<b>0,0005</b>
		CC+CT vs. T/T	R	0,80 (0,29-2,15)	0,66
		A	0,61 (0,45-0,82)	0,001	
NOX3	rs12195525 G>T	GG vs. GT+TT	D	0,95 (0,68-1,33)	0,78
		GG+GT vs. TT	R	0,96 (0,23-3,88)	0,95
			A	0,96 (0,70-1,31)	0,79
	rs231954 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,88 (0,65-1,18)	0,39
		TT+CT vs. CC	R	0,97 (0,67-1,41)	0,86
			A	0,93 (0,76-1,14)	0,51
	rs34960420 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,95 (0,68-1,34)	0,79
			R	NC	
			A	NC	
NOX5	rs2277552 C>T	CC vs. CT+TT	D	0,88 (0,46-1,66)	0,68
			R	NC	
			A	NC	
	rs12907196 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,86 (0,64-1,16)	0,33
		TT+CT vs. CC	R	1,14 (0,82-1,57)	0,44
			A	0,9 (0,81-1,19)	0,87
XDH	rs17011368 T>C	TT vs. CT+CC	D	1,13 (0,76-1,67)	0,55
			R	NC	
			A	NC	
	rs1884725 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,95 (0,72-1,25)	0,71
		GG+AG vs. AA	R	1,34 (0,76-2,35)	0,31
			A	1,00 (0,79-1,28)	0,95
NOS2	rs2297518 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,97 (0,71-1,33)	0,84
		GG+AG vs. AA	<b>R</b>	<b>0,19 (0,046-0,75)</b>	<b>0,018</b>
			A	0,85 (0,65-1,11)	0,24
	rs1060826 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,97 (0,71-1,33)	0,88
		GG+AG vs. AA	R	1,00 (0,71-1,41)	0,99
		A	0,99 (0,81-1,21)	0,92	
RAC2	rs2239774 G>C	GG vs. GC+CC	D	0,77 (0,57-1,05)	0,01
		GG+GC vs. CC	R	0,38 (0,14-1,03)	0,058
			<b>A</b>	<b>0,75 (0,58-0,98)</b>	<b>0,037</b>
	rs1064498 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,76 (0,56-1,04)	0,088
		TT+CT vs. CC	R	2,17 (0,80-5,89)	0,13
		A	0,82 (0,61-1,10)	0,19	

Mod: modelo A: aditivo, R: recesivo, D: dominante, HR (del inglés 'Hazard Ratio') NC: no calculable

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

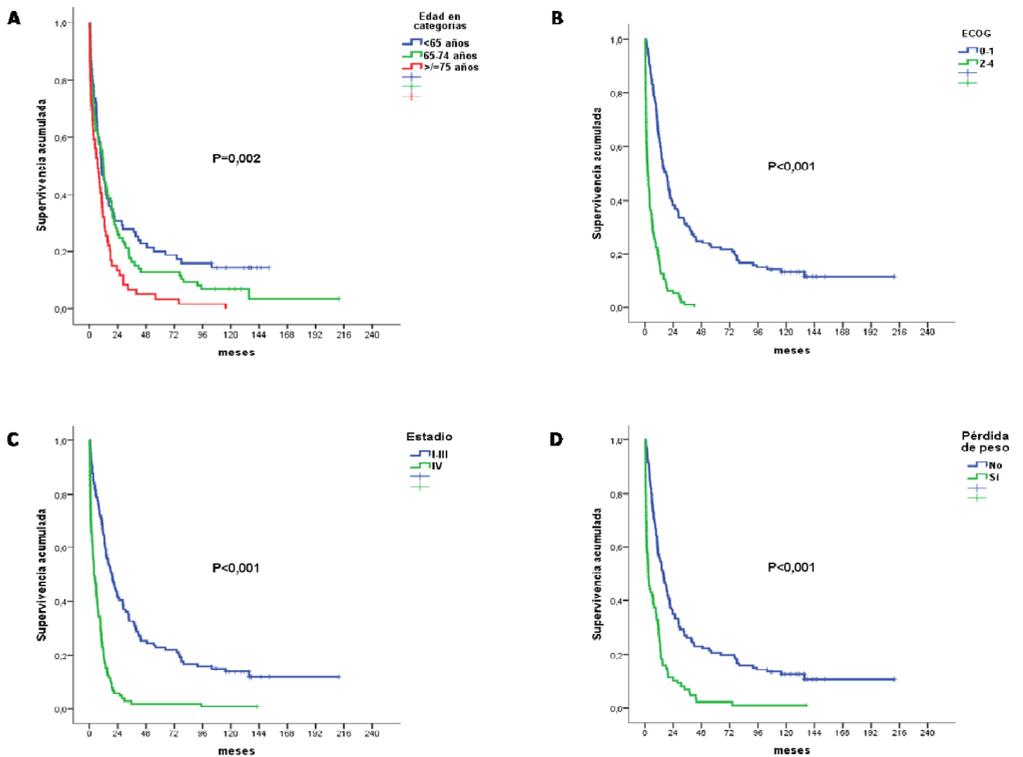
Influencia de los factores pronósticos clásicos en la supervivencia de la población global: Se realizaron análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier y se estimó la influencia de la edad, el EGOG, la pérdida de peso y el estadio en la supervivencia mediante la prueba de los rangos logarítmicos. Todos estos factores tuvieron un impacto negativo en la supervivencia estadísticamente significativo (Tabla 20).

<b>Tabla 20: Supervivencia de la población global (N=219) asociada a los factores pronósticos clínicos</b>					
<b>Característica</b>	<b>1 año (%)</b>	<b>2 años (%)</b>	<b>5 años (%)</b>	<b>10 años (%)</b>	<b>P*</b>
Población total	43,4	24,2	12,8	7,6	
Edad (años)					
<65	45,3	30,7	20,0	14,5	0,002
65-74	49,4	25,9	12,9	7,1	
≥75	32,2	13,6	3,4	0	
Estado general (ECOG)					
0-1	63,2	38,4	22,4	11,7	<0,0001
≥2	17,0	5,3	0	0	
Pérdida de peso (v.p.=2)					
No	56,3	34,9	20,6	12,5	<0,0001
Si	26,1	10,2	2,3	1,1	
Estadio					
I-III	64,9	41,2	22,8	13,8	<0,0001
IV	20,0	5,7	1,9	1,0	
<i>NCF4</i> (rs-2075939)					
CC	36,4	21,2	9,3	2,6	0,0004
CT+TT	59,7	30,6	21,0	19,4	

\*Valor de la p según la prueba de los rangos logarítmicos

La figura 21 muestra las curvas de supervivencia de la población global asociada a las variables de edad, ECOG, estadio y pérdida de peso.

Figura 21: curvas de supervivencia de la población global (N=219) asociada a las variables de edad (A), ECOG (B), estadio (C) y pérdida de peso (D)



Se realizó un análisis de Cox multivariado ajustado por edad, ECOG, pérdida de peso y estadio para evaluar la asociación de *NCF4* rs2075939 con la supervivencia. La edad, el ECOG, la pérdida de peso y el estadio se mantuvieron como factores independientes asociados a la supervivencia. No se mantuvo la asociación con la supervivencia del SNP de *NCF4*. La tabla 21 muestra los resultados de este análisis

*Tabla 21: Análisis de Cox uni- y multivariado para la supervivencia global en la población global (N=219).*

Característica	Univariado			Multivariado		
	HR	IC 95% HR	P	HR	IC 95% HR	P
Edad			0,002			0,010
<65	1	1		1	1	
65-74	1,23	0,88-1,71	0,222	1,09	0,78-1,54	0,610
≥75	1,89	1,32-2,71	0,001	1,74	1,19-2,56	0,005
ECOG			<0,001			<0,001
0-1	1	1		1	1	
2-4	4,08	3,01-5,53		2,99	2,16-4,16	
Pérdida de peso			<0,001			<0,001
No	1	1		1	1	
Sí	2,53	1,89-3,38		2,14	1,57-2,91	
Estadio			<0,001			<0,001
I-III	1	1		1	1	
IV	3,23	2,40-4,35		3,16	2,29-4,34	
<i>NCF4</i> (rs2075939)			0,0004	-	-	N.S.
CC	1	1				
CT+TT	0,56	0,41-0,78				

N.S.: no significativo , HR: (hazard ratio)

Se evaluó la distribución de las variables pronósticas en relación con la presencia del polimorfismo rs2075939 en *NCF4* en la población global de cáncer de pulmón y se objetivó una asociación significativa con el estadio. Los pacientes en estadio I-III presentaron una incidencia mayor del alelo T en homocigosis o heterocigosis. La tabla 22 muestra la distribución de estas características en relación con el polimorfismo

Tabla 22. Distribución de las variables pronósticas en relación con la presencia del polimorfismo rs2075939 en NCF4 en la población global de cáncer de pulmón (N=219)

Característica	CC		CT+TT		P
	N	%	N	%	
Edad					0,405
<65	57	37,7	18	29,0	
65-74	55	36,4	28	45,2	
≥75	39	25,8	16	25,8	
ECOG					0,039
0-1	79	52,3	42	67,7	
2-4	72	47,7	20	32,3	
Pérdida de peso					0,944
No	84	57,5	36	58,1	
Sí	62	42,5	26	41,9	
Estadio					<b>0,0002</b>
I-III	65	43,0	44	71,0	
IV	86	57,0	18	29,0	

Al detectar esta asociación del polimorfismo con estadios I-III se realizó un análisis de Cox estratificado para estadios I-III. La edad, el ECOG y la pérdida de peso mantuvieron una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia pero no se detectó asociación significativa entre la supervivencia y el polimorfismo (Tabla 23).

Tabla 23. Estudio de supervivencia uni- y multivariado para la supervivencia en la población global: Análisis restringido a estadios I-III (N=114).

Característica	Univariado			Multivariado		
	HR	IC 95% HR	P	HR	IC 95% HR	P
Edad			<0,001			0,003
<65	1	1		1	1	
65-74	1,91	1,14-3,18	0,013	1,67	0,98-2,85	0,061
≥75	3,51	2,03-6,06	<0,001	2,87	1,55-5,28	0,001
ECOG			<0,001			0,014
0-1	1	1		1	1	
2-4	2,96	1,84-4,75		1,91	1,14-3,20	
Pérdida de peso			<0,001			<0,001
No	1	1		1	1	
Sí	2,30	1,50-3,51		2,31	1,48-3,60	
<i>NCF4</i> (rs2075939)			0,021	-	-	N.S.
CC	1	1				
CT+TT	0,60	0,39-0,93				

También se completó el análisis de la relación entre la supervivencia y las variables independientes (incluyendo el polimorfismo en *NCF4*) mediante la metodología CART. En el primer nodo fue el polimorfismo en *NCF4* la variable seleccionada por el árbol para discriminar supervivencia (Figura 22).

Cuando se realizó el CART estratificado por el estadio, *NCF4* ocupó el segundo nodo tras la edad sólo para los estadios I-III (Figura 23).

Figura 22: CART en población global (N=219). Evaluación de la supervivencia

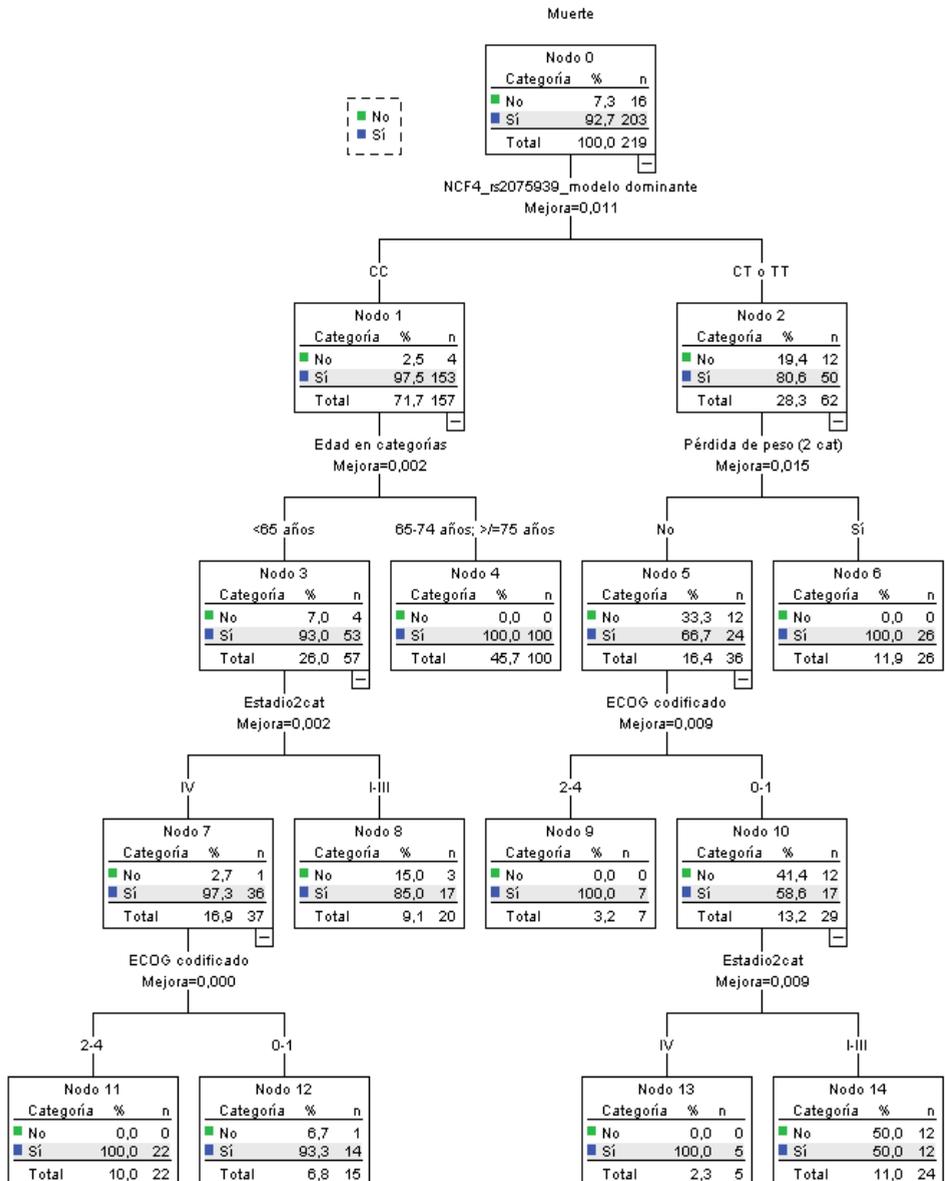
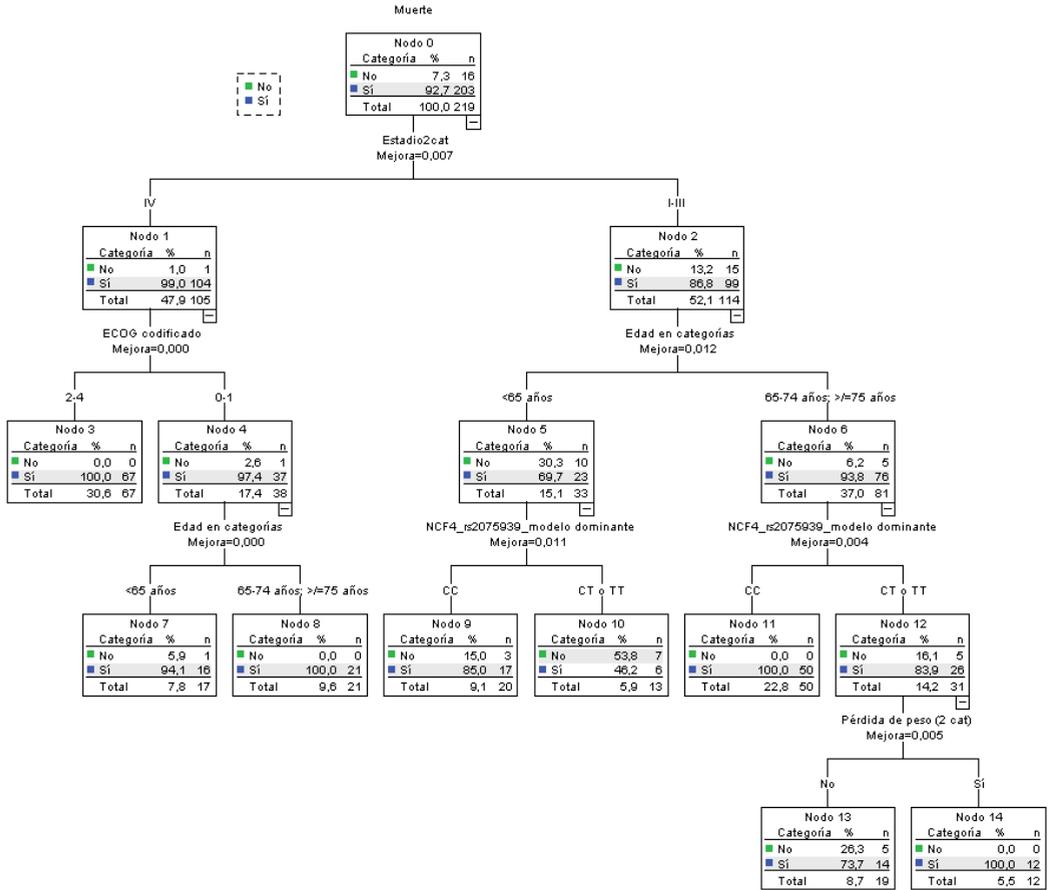


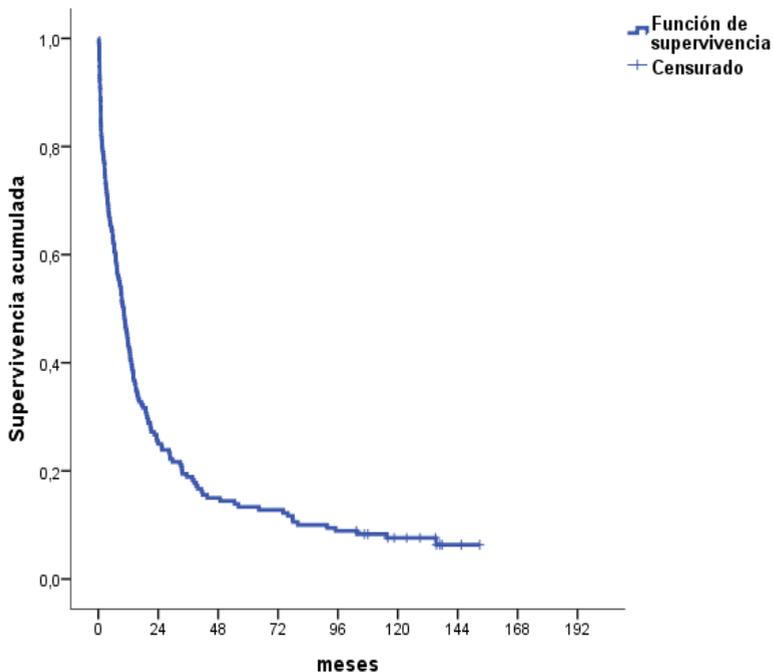
Figura 23: CART en población global (N= 219) estratificado por estado



### 5.6.2. Población con cáncer no microcítico de pulmón

Se realizó también el análisis de supervivencia en los 180 pacientes que representaron la población de CPNM. Se constató que, tras una mediana de seguimiento de 135 meses (intervalo 103-153 meses), 167 pacientes habían fallecido. La supervivencia global de la población de CPNM fue del 43,3%, 25,0% y 13,3% al año, a los dos y a los cinco años, respectivamente. La mediana de supervivencia en este grupo de población fue de 9,9 meses. La figura 24 muestra la curva de supervivencia de la población de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)

Figura 24: curva de supervivencia CPNM (N=180)



## Influencia de los polimorfismos en la supervivencia de la población de cáncer de pulmón no microcítico:

Se evaluó la influencia de cada uno de los polimorfismos en la supervivencia global mediante curvas de Kaplan-Meier y la prueba de los rangos logarítmicos (Tabla 24). Se observó que sólo el SNP *NCF4* rs2075939 (C>T) presentó una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia (HR: 0,51; IC 95% HR: 0,35-074;  $p=0,0003$ ) de acuerdo con un modelo dominante. La supervivencia al año, a los 2 años, a los 5 años y a los 10 años de los individuos con la variante CT o TT fue significativamente superior que la de los pacientes portadores de la variante consenso CC (Tabla 25 y figura 25).

El polimorfismo rs2239774 en *RAC2* (modelo aditivo) presentó una asociación marginalmente significativa con la supervivencia (tabla 24).

*Figura 25: Curvas de supervivencia global en cáncer de pulmón no microcítico (N=180) en función del polimorfismo rs2075939 en NCF4.*

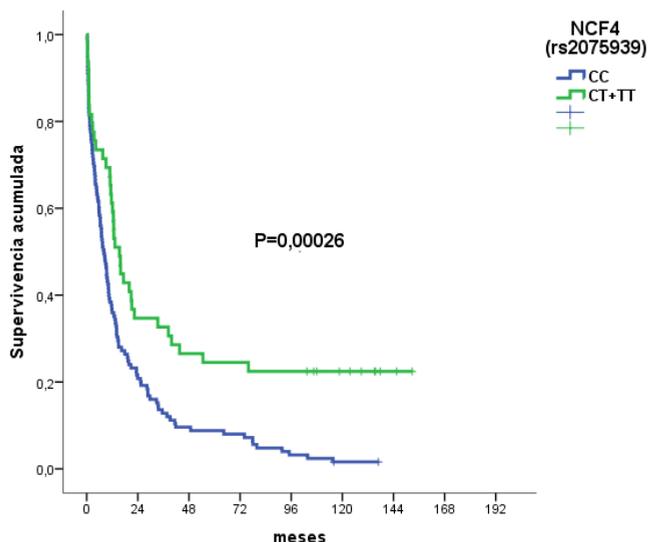


Tabla 24: Análisis univariado de la asociación de los polimorfismos con la supervivencia en la población de cáncer de pulmón no microcítico (N=180).

Gene	SNP ref.	Genotipo	Mod.	OR (IC 95%)	P (Cox)
NCF2	rs2274064 T>C	TT vs. CT+CC	D	1,08 (0,76-1,52)	0,67
		TT+CT vs. CC	R	1,13 (0,76-1,67)	0,55
			A	1,07 (0,86-1,35)	0,54
NCF4	rs2072712 C>T	CC vs. CT+TT	D	0,72 (0,49-1,05)	0,086
		CC+CT vs. TT	R	NC	
			A	NC	
	rs2075939 C>T	CC vs. CT+TT	D	<b>0,51 (0,35-0,74)</b>	<b>0,0003</b>
		CC+CT vs. T/T	R	0,75 (0,19-3,04)	0,69
		A	<b>0,54 (0,38-0,77)</b>	<b>0,001</b>	
NOX3	rs12195525 G>T	GG vs. GT+TT	D	0,96 (0,65-1,41)	0,83
		GG+GT vs. TT	R	0,95 (0,23-3,86)	0,94
			A	0,96 (0,67-1,36)	0,83
	rs231954 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,92 (0,67-1,28)	0,64
		TT+CT vs. CC	R	0,88 (0,58-1,34)	0,56
			A	0,93 (0,75-1,16)	0,53
	rs34960420 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,95 (0,65-1,40)	0,81
			R	NC	
			A	NC	
NOX5	rs2277552 C>T	CC vs. CT+TT	D	1,11 (0,54-2,26)	0,77
			R	NC	
			A	NC	
	rs12907196 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,83 (0,59-1,15)	0,26
		TT+CT vs. CC	R	1,04 (0,73-1,49)	0,83
		A	0,94 (0,76-1,16)	0,56	
XDH	rs17011368 T>C	TT vs. CT+CC	D	1,29 (0,85-1,95)	0,23
			R	NC	
			A	NC	
	rs1884725 G>A	GG vs. AG+AA	D	1,05 (0,77-1,42)	0,77
		GG+AG vs. AA	R	1,61 (0,85-3,07)	0,14
		A	1,10 (0,85-1,44)	0,45	
NOS2	rs2297518 G>A	GG vs. AG+AA	D	1,22 (0,86-1,73)	0,26
		GG+AG vs. AA	R	0,40 (0,01-1,63)	0,20
			A	1,08 (0,80-1,46)	0,61
	rs1060826 G>A	GG vs. AG+AA	D	0,86 (0,61-1,20)	0,37
		GG+AG vs. AA	R	0,95 (0,65-1,38)	0,77
		A	0,92 (0,74-1,15)	0,45	
RAC2	rs2239774 G>C	GG vs. GC+CC	D	0,73 (0,51-1,02)	0,069
		GG+GC vs. CC	R	0,34 (0,11-1,06)	0,062
			A	<b>0,72 (0,53-0,96)</b>	<b>0,026</b>
	rs1064498 T>C	TT vs. CT+CC	D	0,79 (0,56-1,10)	0,17
		TT+CT vs. CC	R	2,22 (0,81-6,02)	0,12
		A	0,85 (0,62-1,18)	0,33	

Mod: modelo A: aditivo, R: recesivo, D: dominante, HR (del inglés 'Hazard Ratio') NC: no calculable

	Marginalmente significativo
	Estadísticamente significativo

Influencia de los factores pronósticos clásicos en la supervivencia de la población de cáncer de pulmón no microcítico: Se realizaron análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier y se estimó la influencia en la supervivencia de la edad, el EGOG, la pérdida de peso y el estadio mediante la prueba de los rangos logarítmicos. Todos estos factores tuvieron un impacto negativo en la supervivencia (tabla 25).

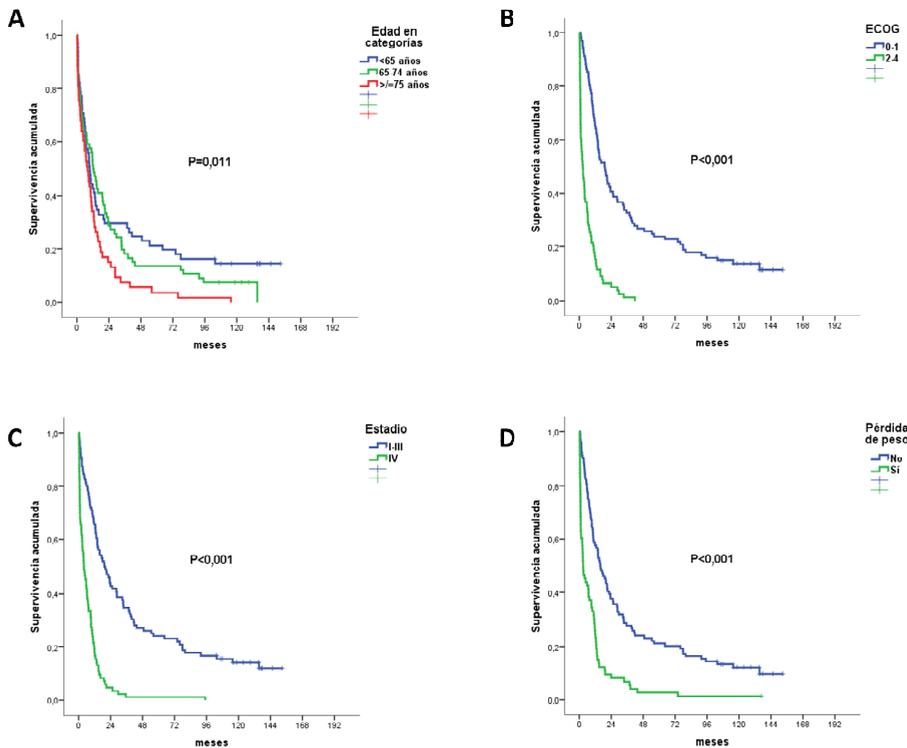
Tabla 25. Supervivencia según las características de la población con cáncer de pulmón no microcítico (N=180)

Característica	1 año (%)	2 años (%)	5 años (%)	10 años (%)	P*
Población total	43,3	25,0	13,3	7,6	
Edad (años)					
<65	42,6	29,5	21,3	14,6	0,011
65-74	51,5	28,8	13,6	7,6	
≥75	34,0	15,1	3,8	0	
Estado general (ECOG)					
0-1					<0,0001
≥ 2	65,3 15,2	40,6 5,1	23,8 0	13,6 0	
Pérdida de peso (v.p.=2)					
No					<0,0001
Si	57,7 24,7	37,5 8,2	21,2 2,7	12,2 1,4	
Estadio					
I-III	65,6	42,7	24,0	14,3	<0,0001
IV	17,9	4,8	1,2	0	
Histología					
Epidermoide	46,0	27,0	15,0	9,0	0,752
Adenocarcinoma	43,6	25,5	10,9	2,7	
Otros	32,0	16,0	12,0	12,0	
<b>NCF4 (rs-2075939)</b>					
<b>CC</b>	<b>36,0</b>	<b>20,8</b>	<b>8,8</b>	<b>1,6</b>	<b>0,0003</b>
<b>CT+TT</b>	<b>61,2</b>	<b>34,7</b>	<b>24,5</b>	<b>22,4</b>	

\*Valor de la p según la prueba de los rangos logarítmicos

La figura 26 muestra las curvas de supervivencia de la población de CPNM en función de las variables de edad, ECOG, estadio y pérdida de peso.

Figura 26: curvas de supervivencia de la población de CPNM (N=180) asociada a las variables de edad (A), ECOG (B), estadio (C) y pérdida de peso (D)



Se realizó un análisis de Cox multivariado ajustado por la edad, el ECOG, la pérdida de peso y el estadio para evaluar la asociación de *NCF4* rs2075939 con la supervivencia. La edad, el ECOG, la pérdida de peso y el estadio se mantuvieron como factores independientes asociados a la supervivencia. Sin embargo, no se

mantuvo la asociación con la supervivencia del SNP de NCF4. La tabla 26 muestra los resultados de este análisis

Tabla 26: Estudio de supervivencia uni- y multivariado para la supervivencia global en la población de cáncer de pulmón no microcítico (N=180)

Característica	Univariado			Multivariado		
	HR	IC 95% HR	P	HR	IC 95% HR	P
Edad			0,002			0,006
<65	1	1		1	1	
65-74	1,17	0,80-1,69	0,222	1,02	0,70-1,49	0,926
≥75	1,77	1,19-2,61	0,001	1,81	1,20-2,73	0,005
ECOG			<0,001			<0,001
0-1	1	1		1	1	
2-4	4,39	3,12-6,16		2,98	2,06-4,32	
Pérdida de peso			<0,001			<0,001
No	1	1		1	1	
Sí	2,66	1,93-2,67		2,36	1,66-3,34	
Estadio			<0,001			<0,001
I-III	1	1		1	1	
IV	3,71	2,65-5,20		3,77	2,61-5,46	
NCF4 (rs2075939)			0,0003	-	-	N.S.
CC	1	1				
CT+TT	0,51	0,35-0,74				

Se evaluó la distribución de las variables pronósticas en relación con la presencia del polimorfismo rs2075939 en NCF4 en la población con cáncer de pulmón no microcítico y se objetivó una asociación significativa con el estadio (Tabla 27). Los pacientes en estadio I-III presentaron una incidencia mayor del alelo T en homocigosis o heterocigosis.

Tabla 27. Distribución de las variables pronósticas en relación con la presencia del polimorfismo rs2075939 en NCF4 en carcinoma de pulmón no microcítico

	CC		CT+TT		
	N	%	N	%	P
Edad					0,188
<65	49	39,2	12	24,5	
65-74	43	34,4	21	42,9	
≥75	33	26,4	16	32,7	
ECOG					0,054
0-1	64	51,2	33	67,3	
2-4	61	48,8	16	32,7	
Pérdida de peso					0,477
No	72	59,0	26	53,1	
Sí	50	41,0	23	46,9	
Estadio					<b>0,0005</b>
I-III	55	44,0	36	73,5	
IV	70	56,0	13	26,5	

Al detectar esta asociación del polimorfismo con estadios I-III se realizó un análisis de Cox estratificado para estadios I-III. La edad, el ECOG y la pérdida de peso mantuvieron una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia. En esta ocasión *NCF4* (rs2075939) también mostró asociación estadísticamente significativa con la supervivencia (Tabla 28).

Tabla 28. Estudio de supervivencia uni- y multivariado para la supervivencia global en la población de cáncer de pulmón no microcítico: Restringido a los estadios I-III (N=96).

Característica	Univariado			Multivariado		
	HR	IC 95% HR	P	HR	IC 95% HR	P
Edad			<0,001			0,002
<65	1	1		1	1	
65-74	1,95	1,08-3,51	0,026	1,84	0,99-3,40	0,051
≥75	4,00	2,20-7,28	<0,001	3,32	1,71-6,48	<0,001
ECOG			<0,001			0,015
0-1	1	1		1	1	
2-4	3,18	1,89-5,34		2,02	1,15-3,56	
Pérdida de peso			<0,001			<0,001
No	1	1		1	1	
Sí	2,39	1,50-3,81		2,51	1,54-4,09	
<b>NCF4 (rs2075939)</b>			<b>0,013</b>			<b>0,028</b>
CC	1	1		1	1	
CT+TT	<b>0,54</b>	<b>0,34-0,88</b>		<b>0,58</b>	<b>0,36-0,94</b>	

También se completó en este grupo de pacientes el análisis de la relación entre la supervivencia y las variables independientes (incluyendo el polimorfismo en *NCF4*) mediante la metodología CART. En el primer nodo fue el polimorfismo en *NCF4* la variable seleccionada por el árbol para discriminar supervivencia (Figura 27).

Cuando se realizó el CART estratificado por el estadio, *NCF4* ocupó el primer nodo para los estadios I-III (Figura 28).

Figura 27. CART en población de cáncer pulmón no microcítico (N=180)

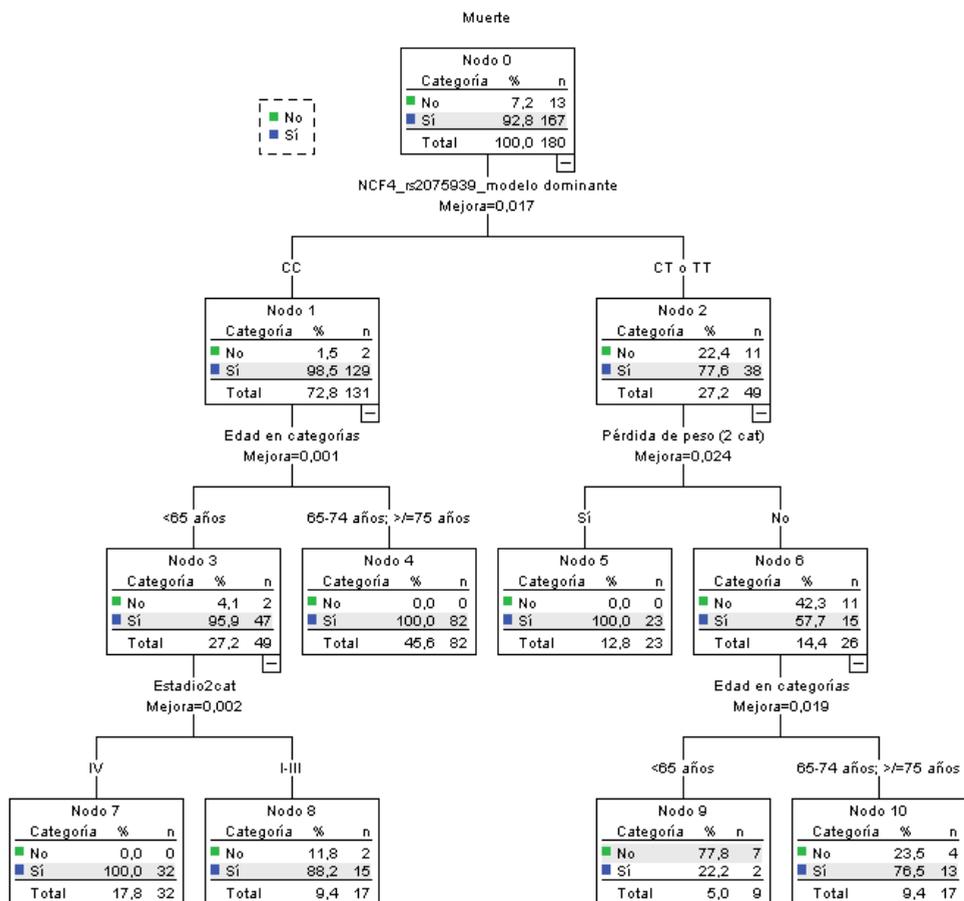
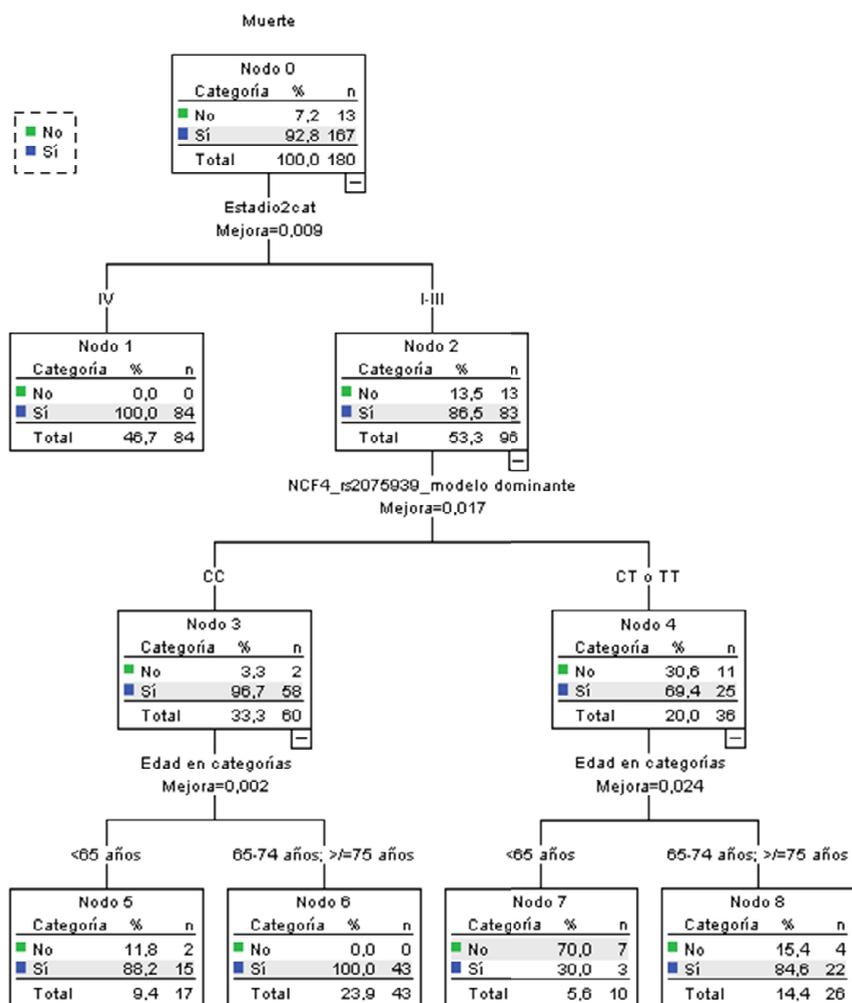


Figura 28. CART en población de cáncer de pulmón no microcítico forzado por estadio (N=180)





# **DISCUSIÓN**

---



## 6. DISCUSIÓN

En esta tesis se presentan los resultados del estudio de la relación entre 14 SNPs localizados en la región codificante de 7 genes relacionados con el estrés oxidativo (en concreto genes relacionados con la producción de radicales libres) con las características, la respuesta y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón. Todos los análisis se realizaron en la población global de los 219 pacientes y la población de cáncer de pulmón no microcítico de 180 pacientes. Por primera vez, se detectaron 3 asociaciones relevantes. El SNP rs2075939(C>T) del gen *NCF4* presentó una asociación estadísticamente significativa con el estadio. El SNP rs231954 (T>C) del gen *NOX3* presentó una asociación estadísticamente significativa con la respuesta y el SNP rs2075939(C>T) del gen *NCF4* se asoció significativamente con la supervivencia en los estadios I-III de CPNM.

Nuestra serie de pacientes no fue recogida de forma prospectiva, por lo que es importante señalar que, a pesar de ello, sus características no son diferentes a las publicadas en los registros estadísticos. La edad mediana de nuestra población al diagnóstico es de 70 años, similar a la edad mediana de las series internacionales y nacionales (204, 205). Un 87% de los pacientes fueron varones y un 13% mujeres. La razón entre hombres y mujeres de nuestra serie es 6,5. Esta razón es prácticamente idéntica a la recogida en la Red Española de Registros de Cáncer en el periodo entre 2003-2007 (la razón fue de 6,3).

La distribución por tipo histológico es parecida a la descrita en otras series (un 82% de la población correspondió a tumores no microcíticos y un 18% a tumores microcíticos). En el grupo de CPNM, un 55% de pacientes presentaron histología de tumor escamoso (45,6% del total de casos con cáncer de pulmón), un 30,5% fueron adenocarcinomas y un 14% no se pudieron clasificar en ninguno de estos

dos grupos (205). Aunque en la última década la frecuencia de tumores epidermoides y adenocarcinomas se ha invertido (23), nuestra serie corresponde a una etapa en que el carcinoma epidermoide era el tumor más frecuente en nuestro medio (206).

Por lo que respecta a la distribución por estadios, esta fue similar en la población global y en la población con cáncer de pulmón no microcítico. En la población global un 19% de pacientes se diagnosticaron en estadios iniciales y un 48% presentó una enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico. Esta proporción es también similar a la comunicada en registros internacionales (204).

Los datos de supervivencia global de nuestra serie de pacientes también concuerdan con los descritos en la literatura. En el periodo comprendido entre 2004 y 2007, la supervivencia estimada a los 12 meses para pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón fue de un 44,5% en los registros SEER (204). La supervivencia a los 5 años estimada en ese mismo periodo para CPNM y CPM fue de un 17.1% y un 6.1%, respectivamente (204). En nuestra serie la supervivencia a los 12 meses es de un 43,4% y la supervivencia para la serie de CPNM a los 5 años es de un 13.3%. Aunque la supervivencia global a los 5 años de nuestra serie es inferior a la descrita en los registros SEER para el mismo periodo, coincide sin embargo, con las cifras de supervivencia absoluta de la mayor parte de regiones europeas (inferiores a un 15%)(205, 207, 208). El origen de estas diferencias procede de la expresión de la supervivencia en términos de “supervivencia relativa” en los registros SEER (204) a diferencia de la supervivencia expresada en términos de “supervivencia absoluta” en el resto de series (205).

## 6.1. Análisis de los resultados

### 6.1.1. Asociación de NCF4 con el estadio y con la supervivencia

El SNP **rs2075939(C>T)** del gen *NCF4* presentó una asociación estadísticamente significativa con el estadio en la población global de pacientes. Los pacientes diagnosticados en estadios I-III presentaron una mayor frecuencia del alelo menor T de *NCF4* (22%) que los pacientes en estadio IV (8,6%). Estos resultados se corroboraron en la población de pacientes con CPNM. Este SNP también se asoció significativamente con la supervivencia en los estadios I-III de CPNM. Los individuos con estadios I-III que presentaron la variante CT o TT exhibieron una supervivencia significativamente superior (42% mayor) que la de los pacientes portadores de la variante consenso (CC).

Como ya hemos mencionado, esta asociación no ha sido descrita en estudios previos. Su asociación podría explicarse, al menos en parte, por la función que tiene *NCF4* en el complejo NADPH-oxidasa. El gen *NCF4* codifica para una proteína que es una subunidad citosólica reguladora del complejo NADPH-oxidasa (209). Específicamente, *NCF4* funciona como estructura de soporte para *NCF2*, *NCF1* y *RAC1*. Tras una infección, el complejo se trasloca a la membrana de la célula fagocítica donde colabora con *NOX2* y  $p22^{\text{phox}}$  para catalizar la producción de EROs y facilitar la erradicación de las bacterias invasoras (210, 211). *NCF4* forma parte, por tanto, del sistema NADPH y existe una evidencia creciente que sugiere que la producción de EROs por las distintas subunidades de la familia *NOX* está relacionada con la proliferación y con la capacidad invasiva de distintos tumores malignos (136, 137). Tenemos numerosos ejemplos en la literatura que corroboran esta evidencia. Se ha descrito que *NOX4* promueve, tanto in vitro como in vivo, la progresión del CPNM a través de la activación de la vía PI3K/Akt. La sobreexpresión de *NOX4* en los pacientes con CPNM se asocia con una

supervivencia desfavorable, lo que sugiere que NOX4 se relacionaría con la presencia de metástasis y se comportaría con un factor pronóstico en el cáncer de pulmón (212-214). La familia de proteínas Rac que están implicadas en la activación de varios miembros del sistema NAPH oxidasa, también se han relacionado con el fenómeno de progresión y metástasis en el cáncer de pulmón (215-217). La expresión de NOX puede ser crucial en el desarrollo de un microambiente oxidativo donde la producción de EROs genere señales proangiogénicas que favorezcan la replicación del tumor y las metástasis (95, 138). Además se ha descrito que la inhibición de la actividad NADPH oxidasa protege frente a las metástasis en el cáncer de próstata (218) y en el cáncer de pulmón (219). Por lo que respecta a NCF4, se ha descrito que su sobreexpresión induce la activación del complejo NADPH oxidasa 2, la producción de EROs, y se relaciona con el fenómeno de Transición Epitelio Mesenquimal (TEM) mediado por EROs (220). El fenómeno de TEM es un proceso esencial asociado a la progresión tumoral y a las metástasis.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio y con los datos existentes en la literatura, sugerimos que la función de NCF4 podría estar relacionada con el desarrollo de metástasis en los pacientes con cáncer de pulmón. El rs2075939 es un SNP no sinónimo en *NCF4* que conlleva un cambio de aminoácido (Pro\_Leu), que podría modificar la función del gen y dar lugar a una disminución o contención del proceso de metastatización (esto explicaría su relación con estadios iniciales de la enfermedad). La consecuencia lógica sería un incremento en la tasa de supervivencia de los individuos portadores del alelo menor. El hecho de que este polimorfismo pierda asociación significativa con la supervivencia en el análisis multivariado de Cox podría explicarse por el tamaño de la muestra que disminuye la potencia del estudio para asociaciones débiles. Desconocemos el modo en que la sustitución del aminoácido induce cambios en

la actividad enzimática de *NCF4* ya que este polimorfismo no ha sido descrito en estudios previos.

Por lo que respecta a la presencia de polimorfismos en *NCF4*, un único estudio reciente ha relacionado rs5993355, un SNP en *NCF4* con un riesgo elevado de desarrollar cáncer colorrectal (221). Se trata de un polimorfismo sinónimo y el trabajo sugiere que la variante alélica no afecta la expresión de *NCF4* pero modula la actividad del complejo NADPH. Las alteraciones en *NCF4* conducirían a un ensamblaje deficiente del complejo NADPH, lo que podría aumentar la susceptibilidad a infecciones recurrentes, con un consiguiente aumento del riesgo de cáncer. Una base de datos de expresión de genes, muestra que la expresión de *NCF4* está reducida en cáncer de colon. Por otra parte, la expresión elevada de este gen se ha asociado a una reducción de la mortalidad (datos procedentes de Prognoscan, una base de datos que contiene perfiles de expresión génica y su repercusión en cáncer) (222).

Adicionalmente al análisis convencional univariado y multivariado de supervivencia, se realizó tanto en la población global, como en la población de CPNM un estudio multivariado mediante la metodología CART para analizar la relación entre las variables independientes y la variable supervivencia. Con esta metodología, en comparación con el modelo de regresión, se identifican variables predictivas que influyen de forma diferente en grupos específicos de pacientes. Por lo tanto, este modelo no es excluyente respecto al de regresión sino que aporta un enfoque diferente. Cuando se aplicó este método a la población de CPNM, el polimorfismo apareció en el primer nodo como la mejor variable asociada a la supervivencia. Cuando se realizó el CART estratificado por estadio, el polimorfismo fue la variable que apareció en el primer nodo para discriminar una mejor supervivencia en los estadios I-III.

Por tanto, este trabajo muestra que el polimorfismo *NCF4* rs2075939 se asocia a la presencia de estadios más iniciales tanto en la población global como en la población de cáncer de pulmón no microcítico y presenta también una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia en los pacientes con CPNM en estadio I-III. Este último hallazgo es interesante porque permitiría discriminar en el grupo de pacientes con estadios I-III, subgrupos con una supervivencia más favorable. No hemos encontrado en la literatura ningún estudio que haya relacionado este polimorfismo con el cáncer de pulmón.

Durante las últimas décadas se han publicado numerosos trabajos cuyo objetivo ha sido analizar la relación de diferentes polimorfismos con el pronóstico del cáncer de pulmón. La metodología, los tamaños muestrales, las características de la población estudiada y los genes evaluados han sido muy variables y, consecuentemente, los resultados obtenidos han sido muy dispares. Entre las vías más estudiadas cabe mencionar el grupo de enzimas glutatión S transferasas (GST), en la que se ha constatado que polimorfismos en *GSTM1* ("genotipo nulo") se asocian a una peor supervivencia en cáncer de pulmón (195, 196); por el contrario polimorfismos en la isoforma *GSTP1* (variante en el exón 6) se han asociado a medianas de supervivencias mayores en pacientes con cáncer de pulmón (197, 198). Una gran cantidad de SNPs en distintos genes han sido evaluados como marcadores pronósticos en cáncer de pulmón. Polimorfismos en genes relacionados con la apoptosis(223), en genes relacionados con reparación del ADN(224), en *CD3EAP*, *AKT1*, en genes de la familia de las caspasas(225-227), se han asociado al pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón tras la cirugía.

Aunque el EO se ha relacionado con la patogénesis, el pronóstico y la respuesta al tratamiento en el cáncer de pulmón, prácticamente no existen trabajos que hayan evaluado el impacto de variantes genéticas en grupos de genes relacionados con

el EO en esta enfermedad. Un estudio reciente ha explorado el efecto de 20 SNPs en 20 genes relacionados con el EO en el pronóstico de 219 pacientes diagnosticados de CPNM y tratados con TKI-EGFR. En el análisis multivariado se identifican 2 SNPs, como factores pronósticos independientes que determinan una supervivencia desfavorable en este grupos de pacientes (rs1695 en *GSTP1* y rs2333227 en el gen de la *MPO*)(193). Ninguno de estos genes ha sido analizado en nuestro estudio.

No pudimos encontrar asociaciones significativas ni con las características de la población, ni con la supervivencia para el resto de los polimorfismos estudiados.

NCF2 es un componente citosólico del complejo NADPH oxidasa y el gen que codifica para esta proteína está regulado al alza por el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  y su gen codificante están relacionados con el desarrollo del cáncer de cérvix mediante el aumento de susceptibilidad a la infección por el virus del papiloma humano (HPV). En un estudio reciente, se ha constatado una sobreexpresión de NCF2 en el cáncer escamoso de cérvix microinvasor(228). Recientemente también se ha identificado *NCF2/p67<sup>phox</sup>* como una nueva diana del gen p53. La actividad pro-apoptótica de p53 y su función como gen supresor está bien documentada. Sin embargo, en los últimos años, se ha descrito un aspecto menos conocido de p53 como mediador activo de vías de señalización anti-apoptóticas con una numerosa lista de dianas anti-apoptóticas dependientes de p53. Se ha sugerido que *NCF2* constituiría una nueva diana antiapoptótica mediada por p53 (229). No hemos identificado ningún estudio en la literatura que analice polimorfismos en este gen y los relacione con el pronóstico en cáncer de pulmón.

NOX5 es una isoforma de la familia NADPH oxidasa. La función de NOX5 es todavía desconocida. Su expresión y su actividad se encuentran alteradas en las

enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, aunque se desconocen sus mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos. Se han identificado múltiples polimorfismos en las secuencias codificantes de este gen, pero se desconoce si estos se traducen en una alteración de la función enzimática. Un trabajo en líneas celulares ha identificado 7 SNPs no sinónimos en *NOX5* que carecen de efecto sobre la actividad enzimática. Se desconoce si la presencia de variantes disfuncionales de *NOX5* en humanos puede alterar la fisiología o el comportamiento de las enfermedades (230).

La XDH constituye un sistema enzimático esencial en la producción de EROs y está implicada en el metabolismo oxidativo de las purinas. Un estudio analizó la expresión de XDH en muestras de tumor de 88 pacientes con adenocarcinoma de pulmón. El hallazgo de niveles elevados de expresión de XDH se comportó como un factor pronóstico independiente asociado a una disminución de la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años (115). Se desconoce el mecanismo por el que la sobreexpresión de XDH puede actuar como un factor de progresión tumoral. Se ha constatado que la disminución de los niveles del gen supresor *SAFB1* induce una sobreexpresión de XDH y la progresión tumoral, lo cual explicaría la supervivencia desfavorable en este grupo de pacientes (231). Otros estudios en diferentes tumores no han podido corroborar este hallazgo (232, 233) e incluso, en otro trabajo sobre pacientes con cáncer de pulmón, se ha objetivado que la reducción de expresión de XDH en las muestras tumorales de 82 pacientes se asoció a una peor supervivencia (135). No tenemos conocimiento de ningún estudio en la literatura que analice polimorfismos en este gen y los relacione con el pronóstico en cáncer de pulmón. Como ya mencionamos en la introducción, un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama, describe la asociación entre rs207454 (un polimorfismo en *XDH*) y una supervivencia libre de enfermedad

significativamente peor en un subgrupo de pacientes con receptores de progesterona negativos (199).

RAC2 forma parte de la familia de proteínas Rac que, a su vez, pertenecen a la familia de GTPasas-Rho que se encuentran sobreexpresadas en una gran variedad de tumores y poseen una amplia gama de funciones dentro de la célula que incluyen la regulación de la migración y adhesión celular, la mitosis, la regulación de la actividad quinasa, así como la regulación de la transcripción de factores a través de la vías de señalización celular (234). En nuestro trabajo, el SNP rs2239774 (G>C) del gen *RAC2* mostró una asociación marginal con la supervivencia, tanto en la población global como en la población de cáncer de pulmón no microcítico. Dado que la asociación no alcanzó los niveles de significación estadística fijados por nuestro estudio no se incluyó en los análisis multivariados. Es posible que el hallazgo sea consecuencia del azar asociado a la comparación múltiple, pero también puede ser debido al tamaño muestral, por lo que podría ser interesante su estudio en otras series, especialmente porque tiene soporte biológico. RAC2 es una proteína que se expresa en las células hematopoyéticas y endoteliales. Un trabajo interesante publicado en el último año, demuestra que RAC2 controla el proceso de diferenciación de los macrófagos M1 en macrófagos M2 (evento importante en la progresión tumoral). En modelos de ratones deficientes para *RAC2* se observaron defectos en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y las metástasis (216). Esto explicaría que un cambio en la función del gen *RAC2* inducido por el polimorfismo sinónimo rs2239774 podría asociarse a una supervivencia más favorable. Por otra parte, no existen trabajos en la literatura que relacionen la presencia de polimorfismos en RAC2 con el pronóstico del cáncer de pulmón.

NOS2 forma parte de la familia de enzimas intracelulares NOS, encargadas de sintetizar el radical libre NO implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos que incluyen, entre otros, la carcinogénesis. Como ya describimos en la introducción de esta tesis, NOS2 no se expresa en las células en reposo, pero es capaz de expresarse rápidamente como respuesta a estímulos proinflamatorios (121). En nuestro estudio el polimorfismo rs2297518 (G>A) en el gen *NOS2* mostró una asociación con la supervivencia marginalmente significativa en la población global de los 219 pacientes. Esta asociación no se objetivó en población con CPNM. Al igual que en el caso de *RAC2*, la magnitud de la asociación no alcanzó la significación fijada por el estudio y no fue subsidiaria de estudio en el análisis multivariado. No existen prácticamente estudios que evalúen el impacto de los polimorfismos en los genes *NOS* en el pronóstico del cáncer de pulmón. Un estudio ha analizado la asociación entre el polimorfismo (CCTTT)<sub>n</sub> en el promotor de *NOS2* con el riesgo de cáncer de pulmón en una población de 185 pacientes con cáncer de pulmón y 164 controles. Los pacientes homocigotos para las repeticiones cortas mostraron un riesgo significativamente aumentado de cáncer de pulmón, comparados con los portadores de los dos alelos largos. Esta asociación fue especialmente significativa entre la población no fumadora (235). En una serie de 108 pacientes diagnosticados de CPNM en estadio III-IV, la mediana de supervivencia fue significativamente mayor en los pacientes portadores del alelo "a" de menor tamaño de un polimorfismo consistente en un número variable de repeticiones en tándem en el intrón 4 (VNTR) del gen *eNOS* (185). El NO puede inducir proliferación o apoptosis dependiendo del contexto celular. Se ha demostrado que la expresión de eNOS en la microcirculación peritumoral constituye un factor pronóstico favorable en las pacientes premenopáusicas con cáncer de mama (236). Por tanto, la presencia de un polimorfismo no sinónimo en *NOS2* podría inducir la liberación de NO, generar apoptosis y derivar en un pronóstico más favorable.

### 6.1.2. Asociación de los polimorfismos con la respuesta

El **SNP *NOX3* rs231954 (T>C)** presentó, tanto en la población global, como en los pacientes con CPNM, una asociación estadísticamente significativa con la respuesta a esquemas de quimioterapia con platino, de acuerdo con un modelo de herencia recesivo. Los pacientes portadores del alelo menor C en homocigosis (genotipo CC) presentaron un riesgo próximo a 6 veces mayor de no responder al tratamiento de quimioterapia con platino, comparado con el resto de pacientes.

Uno de los fármacos más activo y más frecuentemente utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón es el cisplatino. El cisplatino genera EROs (139) que pueden producir daño tisular extenso mediante su interacción con todas las macromoléculas biológicas, como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Las combinaciones de quimioterapia con cisplatino inducen una disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes que pueden ser consecuencia de un fracaso de los mecanismos de defensa antioxidantes o de un consumo de los mismos frente al daño oxidativo (143). Varios estudios muestran niveles elevados de malondialdehído (MDA) en pacientes con cáncer de pulmón y confirman un aumento de la peroxidación lipídica en estadios avanzados (133, 144). Tras la quimioterapia también se observa aumento de los niveles de nitritos y disminución de los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión (GSH) (133).

Aunque la quimioterapia basada en platino ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón, las tasas de respuesta siguen siendo bajas y existe una gran variabilidad interindividual en las tasas de respuesta. Todo ello justifica el interés de estudiar la influencia de los polimorfismos en genes relacionados con el EO en la respuesta a los esquemas con platino

*NOX3* codifica para una isoforma de la subunidad catalítica del complejo NADPH oxidasa, que como ya hemos visto constituye un importante fuente endógena de EROs. El cisplatino activa la expresión de los genes *NOX* (incluido *NOX3*) (237, 238). *NOX3* se expresa en las células epiteliales sensoriales de la cóclea y el vestíbulo del oído interno y se ha relacionado con la génesis del sistema de otolitos y con la percepción de la gravedad y el equilibrio (99, 100). Estudios recientes han identificado que la isoforma *NOX3* constituye la fuente principal de EROs utilizada por el cisplatino en la cóclea y por tanto tiene un papel esencial en la ototoxicidad mediada por este fármaco (239). Esto indica que esta isoforma interacciona con el cisplatino por lo que parece plausible que por algún mecanismo, todavía por determinar, influya en el mecanismo de respuesta a este fármaco.

La activación de la mayoría de enzimas *NOX* y la producción de EROs requiere el ensamblaje con numerosas proteínas reguladoras para constituir complejos enzimáticos funcionales.  $p22^{\text{phox}}$  es una de estas proteínas reguladoras, cuya función principal es estabilizar las enzimas *NOX* a las que se une. Este hecho se sustenta por varios estudios que demuestran que la regulación a la baja de  $p22^{\text{phox}}$  da lugar a una disminución de la actividad de varias enzimas *NOX* (91, 240). Un estudio ha demostrado que  $p22^{\text{phox}}$  modula la resistencia a cisplatino en el carcinoma epidermoide de cavidad oral (CECO). Se ha encontrado una expresión elevada de esta proteína en el tejido tumoral de pacientes con CECO resistentes a cisplatino. Los estudios "in vitro" han revelado que la sobreexpresión de  $p22^{\text{phox}}$  disminuye la apoptosis inducida por el cisplatino y confiere un efecto citoprotector frente a este fármaco (241). Este estudio demuestra por primera vez que  $p22^{\text{phox}}$ , un componente crucial para la activación de NADPH oxidasa, modula la resistencia al cisplatino. *NOX3* forma parte de este complejo. Aunque *NOX3* rs231954 (T>C) es un SNP sinónimo y no modifica la secuencia de aminoácidos de

la proteína, podrían alterar su función y su relación con proteínas reguladoras como p22<sup>phox</sup>.

En ambas poblaciones, como método de corroboración de los resultados obtenidos, se completó el análisis de la relación entre la respuesta a esquemas con platino y el resto de variables con la metodología CART. En la población global, el primer nodo del árbol estableció que el parámetro que más se asociaba a la ausencia de respuesta a la quimioterapia, era la presencia del polimorfismo *NOX3* (rs231654). En la población con CPNM el primer nodo relacionado con la respuesta fue el estadio. En el segundo nodo el polimorfismo en *NOX3* fue la variable más relacionada con la ausencia de respuesta para los estadios localizados y avanzados.

El SNP rs1060826 (G>A) en *NOS2* se asoció marginalmente con una respuesta desfavorable a la quimioterapia basada en platino, tanto en la población global como en la población de CPNM. No obstante, al no alcanzar la significación estadística exigida por el estudio, no se incluyó en las pruebas de regresión logística. *NOS2* se ha relacionado con la angiogénesis en el cáncer de pulmón (242). También recientemente se ha descrito que el cisplatino induce una regulación al alza de *NOS2*, ello da lugar a un aumento de la producción de NO y confiere resistencia al cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón (243). Estos datos podrían explicar que modificaciones en la expresión de este gen se relacionaran con la respuesta al tratamiento. Un estudio analizó 35 SNPs en *NOS2* y *NOS3* en una cohorte de 198 pacientes con CPNM tratados con quimioterapia y radioterapia. No se halló relación entre ninguna de estas variantes genéticas y la respuesta al tratamiento (184). El polimorfismo de nuestro estudio no se encontraba entre los SNPs analizados.

La mayoría de estudios de asociación entre variables genéticas y respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón han explorado polimorfismos en los genes relacionados con la vía de reparación del DNA (ERCC1, XRCC1, XPG, XPD)(155-162). Se dispone de pocos estudios que relacionen el impacto de polimorfismos en conjuntos de genes relacionados con el EO en la respuesta a los tratamientos en la población con cáncer de pulmón.

Uno de los aspectos a destacar de esta tesis es su carácter novedoso. No existe ningún trabajo previo que haya analizado conjuntamente este grupo de polimorfismos en genes que codifican proteínas productoras de radicales libres en la población de pacientes con cáncer de pulmón. Por tanto, nuestro estudio proporciona, por primera vez, evidencia de un impacto significativo de varios polimorfismos en genes relacionados con el EO en una población de pacientes con cáncer de pulmón. El SNP de *NCF4* (rs2075939) se asocia significativamente a la supervivencia y al estadio y el SNP de *NOX3* (rs231954) se asocia con una respuesta desfavorable al cisplatino. En el caso del SNP en *NCF4*, sugerimos que su influencia puede atribuirse a la relación de la función de *NCF4* con el desarrollo de metástasis, que podría verse restringida en aquellos pacientes portadores del alelo menor. En el caso del SNP en *NOX3*, su influencia sobre la respuesta podría estar relacionada con la implicación de este gen en la resistencia al platino, lo que podría verse potenciado en los portadores homocigotos del alelo menor.

Aunque los resultados son llamativos, hay que evaluarlos con cautela. Durante décadas hemos asistido a la identificación de incontables SNPs en genes potencialmente implicados en el desarrollo y la progresión del cáncer. Sin embargo, el proceso de carcinogénesis es un proceso complejo caracterizado por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que colectivamente dirigen la proliferación tumoral. Por tanto, resulta poco probable,

que un único polimorfismo induzca efectos dramáticos en el pronóstico y en la respuesta a los tratamientos de los procesos tumorales. Parece lógico que el análisis combinado de grupos de polimorfismos que hayan demostrado impacto en algunos aspectos del tumor, pueda proporcionar una información mayor sobre la magnitud del impacto de estas variables genéticas que el análisis por separado de cada una de ellas.

Por ello, los resultados de estudio deberían confirmarse en una serie de pacientes más amplia, con una metodología prospectiva y posiblemente con un análisis combinado con un mayor número de SNPs.

## **6.2. Debilidades del estudio**

Al interpretar nuestros resultados hay que tener en cuenta una serie de circunstancias que pueden limitar su valor.

En primer lugar, se trata de un estudio retrospectivo. Este hecho puede condicionar que la muestra seleccionada puede no ser representativa de una población normal de cáncer de pulmón y, por lo tanto, se halle sujeta a sesgos de selección. A pesar de ello, conviene destacar de nuevo que las características de nuestra población fueron similares a las descritas en la literatura. En segundo lugar, el tamaño de la muestra es pequeño y esto, indudablemente, puede cuestionar el valor de las asociaciones encontradas porque la potencia del estudio puede estar muy influida por el tamaño muestral.

### 6.3. Fortalezas del estudio

En contrapartida, el estudio tiene algunas características que hacen que sus resultados merezcan, al menos, ser replicadas en otras series. En particular, los hallazgos significativos se han considerado tras la corrección para comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni. Esta prueba es la más exigente para corregir este efecto, por lo que los hallazgos significativos encontrados es muy probable que realmente lo sean.

Por otra parte, se han utilizado diversas herramientas estadísticas como es la regresión (Cox y Logística) y el CART, lo que ha permitido valorar el impacto de los polimorfismos significativos con una buena concordancia entre las metodologías utilizadas.

Merece la pena destacar que la obtención de los datos procedentes de la revisión de historias clínicas ha sido realizada por un único observador lo que garantiza la homogeneidad en la recogida de los mismos.

Finalmente, la información referente al seguimiento de los pacientes ha sido rigurosamente evaluada. No existe ninguna pérdida de seguimiento. Los datos de mortalidad de los pacientes han sido recogidos de las historias clínicas y confirmados en su totalidad en el Registro Nacional de Mortalidad lo que confiere una mayor validez al análisis.

# **CONCLUSIONES**

---



## 7. CONCLUSIONES

### 1. Primera conclusión:

**El SNP *NCF4* rs2075939(C>T)** presenta una asociación estadísticamente significativa con el estadio. Los pacientes diagnosticados en estadios I-III presentan una mayor frecuencia del alelo menor T de *NCF4* que los pacientes en estadio IV, tanto en la población global (OR: 0,31; IC 95% OR: 0,17-0,58;  $p=0,0001$ ), como en la población de CPNM (OR: 0,30; IC 95% OR: 0,15-0,62;  $p=0,0005$ ).

### 2. Segunda conclusión:

**El SNP *NOX3* rs231954 (T>C)** se asocia con la respuesta. Los pacientes que no responden a la quimioterapia basada en platino presentan una mayor frecuencia del alelo menor C de *NOX3* que aquellos que responden a la quimioterapia, tanto en la población global (OR: 6,08; IC 95% OR: 2,01-18,41;  $p=0,0015$ ) como en la población de cáncer de pulmón no microcítico (OR: 5,67; IC 95% OR: 1,65-19,41;  $p=0,0031$ ).

### 3. Tercera conclusión:

**El SNP *NCF4* rs2075939(C>T)** se asocia con la supervivencia de acuerdo con un modelo dominante, en el que los individuos portadores del alelo T presentan una mejor tasa de supervivencia que los no portadores, en la población de CPNM con estadios I-III (HR: 0,58; IC 95% OR: 0,36-0,94;  $p=0,028$ ).



# **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300. PubMed PMID: 20610543.
2. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e1S-29S. PubMed PMID: 23649439.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. PubMed PMID: 25220842.
4. Haiman CA, Stram DO, Wilkens LR, Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006 Jan 26;354(4):333-42. PubMed PMID: 16436765.
5. Soo RA, Loh M, Mok TS, Ou SH, Cho BC, Yeo WL, et al. Ethnic differences in survival outcome in patients with advanced stage non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011 Jun;6(6):1030-8. PubMed PMID: 21532500.
6. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S. PubMed PMID: 12527563.
7. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Jan 21;96(2):99-106. PubMed PMID: 14734699.
8. Lloyd JW. Long-term mortality study of steelworkers. V. Respiratory cancer in coke plant workers. *Journal of occupational medicine : official*

publication of the Industrial Medical Association. 1971 Feb;13(2):53-68. PubMed PMID: 5546197.

9. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The Lancet Oncology*. 2009 May;10(5):453-4. PubMed PMID: 19418618.

10. Frost G, Darnton A, Harding AH. The effect of smoking on the risk of lung cancer mortality for asbestos workers in Great Britain (1971-2005). *The Annals of occupational hygiene*. 2011 Apr;55(3):239-47. PubMed PMID: 21252055.

11. Lubin JH, Boice JD, Jr., Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995 Jun 7;87(11):817-27. PubMed PMID: 7791231.

12. Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, et al. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology*. 2005 Mar;16(2):137-45. PubMed PMID: 15703527.

13. Chen BH, Hong CJ, Pandey MR, Smith KR. Indoor air pollution in developing countries. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. 1990;43(3):127-38. PubMed PMID: 2238693.

14. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer causes & control : CCC*. 2010 Jul;21(7):1091-104. PubMed PMID: 20306329.

15. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Archives of internal medicine*. 2003 Jun 23;163(12):1475-80. PubMed PMID: 12824098.

16. Fan YG, Jiang Y, Chang RS, Yao SX, Jin P, Wang W, et al. Prior lung disease and lung cancer risk in an occupational-based cohort in Yunnan, China. *Lung cancer*. 2011 May;72(2):258-63. PubMed PMID: 21367481.
17. Samet JM. Does idiopathic pulmonary fibrosis increase lung cancer risk? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Jan;161(1):1-2. PubMed PMID: 10619788.
18. Ozawa Y, Suda T, Naito T, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, et al. Cumulative incidence of and predictive factors for lung cancer in IPF. *Respirology*. 2009 Jul;14(5):723-8. PubMed PMID: 19659650.
19. Rosenthal AK, McLaughlin JK, Gridley G, Nyren O. Incidence of cancer among patients with systemic sclerosis. *Cancer*. 1995 Sep 1;76(5):910-4. PubMed PMID: 8625197.
20. Hill CL, Nguyen AM, Roder D, Roberts-Thomson P. Risk of cancer in patients with scleroderma: a population based cohort study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003 Aug;62(8):728-31. PubMed PMID: 12860727. Pubmed Central PMCID: 1754624.
21. Shiels MS, Cole SR, Kirk GD, Poole C. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2009 Dec;52(5):611-22. PubMed PMID: 19770804. Pubmed Central PMCID: 2790038.
22. Novaes FT, Cataneo DC, Ruiz Junior RL, Defaveri J, Michelin OC, Cataneo AJ. Lung cancer: histology, staging, treatment and survival. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2008 Aug;34(8):595-600. PubMed PMID: 18797744.
23. Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT. Lung cancer. *Radiologic clinics of North America*. 2007 Jan;45(1):21-43. PubMed PMID: 17157622.

24. Clinical Lung Cancer Genome P, Network Genomic M. A genomics-based classification of human lung tumors. *Science translational medicine*. 2013 Oct 30;5(209):209ra153. PubMed PMID: 24174329. Pubmed Central PMCID: 4006630.
25. Pietanza MC, Ladanyi M. Bringing the genomic landscape of small-cell lung cancer into focus. *Nature genetics*. 2012 Oct;44(10):1074-5. PubMed PMID: 23011222.
26. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung cancer*. 2011 Oct;74(1):139-44. PubMed PMID: 21353324.
27. Zimmermann S, Peters S. Going beyond EGFR. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012 Sep;23 Suppl 10:x197-203. PubMed PMID: 22987962.
28. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature medicine*. 2012 Mar;18(3):378-81. PubMed PMID: 22327623.
29. Lira ME, Kim TM, Huang D, Deng S, Koh Y, Jang B, et al. Multiplexed gene expression and fusion transcript analysis to detect ALK fusions in lung cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2013 Jan;15(1):51-61. PubMed PMID: 23246132.
30. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England journal of medicine*. 2010 Jun 24;362(25):2380-8. PubMed PMID: 20573926.
31. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2011 Aug;12(8):735-42. PubMed PMID: 21783417.

32. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012 Mar;13(3):239-46. PubMed PMID: 22285168.
33. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2010 Feb;11(2):121-8. PubMed PMID: 20022809.
34. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 2009 Sep 3;361(10):947-57. PubMed PMID: 19692680.
35. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014 Feb;15(2):213-22. PubMed PMID: 24439929.
36. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013 Sep 20;31(27):3327-34. PubMed PMID: 23816960.
37. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2014 Dec 4;371(23):2167-77. PubMed PMID: 25470694.
38. Kim Y, Hammerman PS, Kim J, Yoon JA, Lee Y, Sun JM, et al. Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian

patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014 Jan 10;32(2):121-8. PubMed PMID: 24323028. Pubmed Central PMCID: 4062710.

39. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer discovery*. 2011 Jun;1(1):78-89. PubMed PMID: 22328973. Pubmed Central PMCID: 3274752.

40. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer treatment reviews*. 2015 Apr;41(4):361-75. PubMed PMID: 25825324.

41. Sriram KB, Larsen JE, Savarimuthu Francis SM, Wright CM, Clarke BE, Duhig EE, et al. Array-comparative genomic hybridization reveals loss of SOCS6 is associated with poor prognosis in primary lung squamous cell carcinoma. *PLoS one*. 2012;7(2):e30398. PubMed PMID: 22363434. Pubmed Central PMCID: 3281847.

42. Bayle J, Letard S, Frank R, Dubreuil P, De Sepulveda P. Suppressor of cytokine signaling 6 associates with KIT and regulates KIT receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Mar 26;279(13):12249-59. PubMed PMID: 14707129.

43. He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, et al. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Nov 25;100(24):14133-8. PubMed PMID: 14617776. Pubmed Central PMCID: 283558.

44. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012 Sep 27;489(7417):519-25. PubMed PMID: 22960745. Pubmed Central PMCID: 3466113.

45. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature reviews Cancer*. 2010 Feb;10(2):116-29. PubMed PMID: 20094046.
46. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature genetics*. 2012 Oct;44(10):1104-10. PubMed PMID: 22941188.
47. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature genetics*. 2012 Oct;44(10):1111-6. PubMed PMID: 22941189. Pubmed Central PMCID: 3557461.
48. Sarvesvaran J, Going JJ, Milroy R, Kaye SB, Keith WN. Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? *Carcinogenesis*. 1999 Aug;20(8):1649-51. PubMed PMID: 10426823.
49. Rohr UP, Rehfeld N, Pflugfelder L, Geddert H, Muller W, Steidl U, et al. Expression of the tyrosine kinase c-kit is an independent prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004 Aug 20;111(2):259-63. PubMed PMID: 15197780.
50. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007 Jan-Feb;57(1):43-66. PubMed PMID: 17237035.
51. Mulshine JL, Sullivan DC. Clinical practice. Lung cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2005 Jun 30;352(26):2714-20. PubMed PMID: 15987920.
52. Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1991 Sep;9(9):1618-26. PubMed PMID: 1651993.

53. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2001 Nov;1(2):99-108. PubMed PMID: 11905809.
54. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e278S-313S. PubMed PMID: 23649443.
55. Ramnath N, Dilling TJ, Harris LJ, Kim AW, Michaud GC, Balekian AA, et al. Treatment of stage III non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e314S-40S. PubMed PMID: 23649445.
56. Socinski MA, Evans T, Gettinger S, Hensing TA, Sequist LV, Ireland B, et al. Treatment of stage IV non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e341S-68S. PubMed PMID: 23649446.
57. Jett JR, Schild SE, Kesler KA, Kalemkerian GP. Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e400S-19S. PubMed PMID: 23649448.
58. Gupta A, Srivastava S, Prasad R, Natu SM, Mittal B, Negi MP, et al. Smoking intensity, oxidative stress and chemotherapy in nonsmall cell lung cancer: a correlated prognostic study. *Bioscience trends*. 2009 Oct;3(5):191-9. PubMed PMID: 20103846.
59. Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, Aubreton S, Laurent H, Richard R, et al. Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung cancer*. 2013 Dec;82(3):383-9. PubMed PMID: 24161719.

60. Romero FJ, Cadenas E. Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes. Studies on low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status. *Pharmacology & therapeutics*. 1987;33(1):179-86. PubMed PMID: 3628471.
61. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications*. 1992;17(4):221-37. PubMed PMID: 1473734.
62. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual review of immunology*. 1994;12:141-79. PubMed PMID: 8011280.
63. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996 May;10(7):709-20. PubMed PMID: 8635688.
64. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>: in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine*. 1994 Jan;16(1):29-33. PubMed PMID: 8299992.
65. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2007 Jul;74(4):324-9. PubMed PMID: 17590367.
66. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993 Aug 12;364(6438):626-32. PubMed PMID: 8394509.
67. Beckman JS, Chen J, Crow JP, Ye YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Progress in brain research*. 1994;103:371-80. PubMed PMID: 7886219.

68. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37. PubMed PMID: 8944624.
69. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free radical research*. 2006 Dec;40(12):1250-8. PubMed PMID: 17090414.
70. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry*. 1987 Jul 15;262(20):9895-901. PubMed PMID: 3036875.
71. Alexander-North LS, North JA, Kiminyo KP, Buettner GR, Spector AA. Polyunsaturated fatty acids increase lipid radical formation induced by oxidant stress in endothelial cells. *Journal of lipid research*. 1994 Oct;35(10):1773-85. PubMed PMID: 7852854.
72. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*. 1994 Sep 26;97(3A):5S-13S; discussion 22S-8S. PubMed PMID: 8085584.
73. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994 Sep 10;344(8924):721-4. PubMed PMID: 7915779.
74. Lippman RD. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Experimental gerontology*. 1985;20(1):1-5. PubMed PMID: 3996485.
75. Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996 Mar 15;327(2):209-14. PubMed PMID: 8619604.
76. Borel P, Grolier P, Boirie Y, Simonet L, Verdier E, Rochette Y, et al. Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to

carotenoid status in healthy subjects. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1998 Jul;132(1):61-6. PubMed PMID: 9665373.

77. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991 Jan 31;349(6308):431-4. PubMed PMID: 1992344.

78. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*. 1991 Apr 9;281(1-2):9-19. PubMed PMID: 1849843.

79. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine*. 1995 Jun;18(6):1033-77. PubMed PMID: 7628729.

80. Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):402-10. PubMed PMID: 17848621. Pubmed Central PMCID: 2200820.

81. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2011 May 1;11(4):341-6. PubMed PMID: 21453242. Pubmed Central PMCID: 3131414.

82. Lunec J, Herbert KE, Jones GDD, Dickinson L, Evans M, Mistry N, et al. Development of a quality control material for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, an in vivo marker of oxidative stress, and comparison of results from different laboratories. *Free radical research*. 2000 Nov;33 Suppl:S27-31. PubMed PMID: 11191272.

83. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2006;43(2):143-81. PubMed PMID: 16517421.

84. Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system--from science to clinic. *Medicinal research reviews*. 2004 Jan;24(1):40-89. PubMed PMID: 14595672.

85. Arner ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Seminars in cancer biology*. 2006 Dec;16(6):420-6. PubMed PMID: 17092741.
86. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine*. 2001 Dec 1;31(11):1287-312. PubMed PMID: 11728801.
87. Prior M, Arosio E, Ferrari M, Lucchese L, Guidi GC, Bosello O. Lipoprotein(a) and general risk factors in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 1995 Dec;14(4):357-63. PubMed PMID: 8708427.
88. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Nov;78(11):6858-62. PubMed PMID: 6947260. Pubmed Central PMCID: 349151.
89. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007 Jan;87(1):245-313. PubMed PMID: 17237347.
90. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Dec 24;274(52):37265-9. PubMed PMID: 10601291.
91. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular signalling*. 2006 Jan;18(1):69-82. PubMed PMID: 15927447.
92. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science*. 1967 Feb 17;155(3764):835-6. PubMed PMID: 6018195.

93. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minnesota medicine*. 1957 May;40(5):309-12. PubMed PMID: 13430573.
94. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA journal of diseases of children*. 1959 Apr;97(4):387-408. PubMed PMID: 13636694.
95. Roy K, Wu Y, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Jiang G, et al. NADPH oxidases and cancer. *Clinical science*. 2015 Jun;128(12):863-75. PubMed PMID: 25818486.
96. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 Jun 28;1657(1):1-22. PubMed PMID: 15238208. Pubmed Central PMCID: 2636547.
97. Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Oct;76(4):760-81. PubMed PMID: 15240752.
98. Juhasz A, Ge Y, Markel S, Chiu A, Matsumoto L, van Balgooy J, et al. Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free radical research*. 2009 Jun;43(6):523-32. PubMed PMID: 19431059. Pubmed Central PMCID: 2843555.
99. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Aug 13;279(33):34250-5. PubMed PMID: 15181005.
100. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Jun 17;280(24):23328-39. PubMed PMID: 15824103.

101. Shono T, Yokoyama N, Uesaka T, Kuroda J, Takeya R, Yamasaki T, et al. Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008 Aug 15;123(4):787-92. PubMed PMID: 18508317.
102. Weyemi U, Caillou B, Talbot M, Ameziane-El-Hassani R, Lacroix L, Lagent-Chevallier O, et al. Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocrine-related cancer*. 2010 Mar;17(1):27-37. PubMed PMID: 19779036.
103. Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kuniwa Y, Ashida A, Goto Y, et al. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer research*. 2009 Mar 15;69(6):2647-54. PubMed PMID: 19276355.
104. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001 May 16;269(1-2):131-40. PubMed PMID: 11376945.
105. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Oct 5;276(40):37594-601. PubMed PMID: 11483596.
106. Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, Harris RJ, Cawley JC, Allsup DJ, et al. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *Journal of immunology*. 2005 Dec 15;175(12):8424-30. PubMed PMID: 16339585.
107. Antony S, Wu Y, Hewitt SM, Anver MR, Butcher D, Jiang G, et al. Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody. *Free radical biology & medicine*. 2013 Dec;65:497-508. PubMed PMID: 23851018. Pubmed Central PMCID: 3859815.

108. Fischer H. Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxidants & redox signaling*. 2009 Oct;11(10):2453-65. PubMed PMID: 19358684. Pubmed Central PMCID: 2823369.
109. Milenkovic M, De Deken X, Jin L, De Felice M, Di Lauro R, Dumont JE, et al. Duox expression and related H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *The Journal of endocrinology*. 2007 Mar;192(3):615-26. PubMed PMID: 17332529.
110. Caillou B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, Ohayon R, et al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Jul;86(7):3351-8. PubMed PMID: 11443211.
111. Luxen S, Belinsky SA, Knaus UG. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer. *Cancer research*. 2008 Feb 15;68(4):1037-45. PubMed PMID: 18281478.
112. Wu Y, Antony S, Meitzler JL, Doroshov JH. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer letters*. 2014 Apr 10;345(2):164-73. PubMed PMID: 23988267. Pubmed Central PMCID: 3935998.
113. Wu Y, Antony S, Hewitt SM, Jiang G, Yang SX, Meitzler JL, et al. Functional activity and tumor-specific expression of dual oxidase 2 in pancreatic cancer cells and human malignancies characterized with a novel monoclonal antibody. *International journal of oncology*. 2013 Apr;42(4):1229-38. PubMed PMID: 23404210. Pubmed Central PMCID: 3622675.
114. Boueiz A, Damarla M, Hassoun PM. Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008 May;294(5):L830-40. PubMed PMID: 18344415.

115. Konno H, Minamiya Y, Saito H, Imai K, Kawaharada Y, Motoyama S, et al. Acquired xanthine dehydrogenase expression shortens survival in patients with resected adenocarcinoma of lung. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012 Oct;33(5):1727-32. PubMed PMID: 22678977.
116. Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, et al. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *The American journal of physiology*. 1990 Apr;258(4 Pt 1):G564-70. PubMed PMID: 2333969.
117. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society transactions*. 2003 Dec;31(Pt 6):1441-4. PubMed PMID: 14641084.
118. Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends in biochemical sciences*. 1989 Dec;14(12):488-92. PubMed PMID: 2696179.
119. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Mar;3(3):214-20. PubMed PMID: 11994742.
120. Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell research*. 2002 Dec;12(5-6):311-20. PubMed PMID: 12528889.
121. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Jan 15;90(2):522-6. PubMed PMID: 7678458. Pubmed Central PMCID: 45695.
122. Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *General physiology and biophysics*. 2005 Sep;24(3):263-78. PubMed PMID: 16308423.

123. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research*. 2004 Feb 15;61(3):461-70. PubMed PMID: 14962477.
124. Masri F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. *Annals of thoracic medicine*. 2010 Jul;5(3):123-7. PubMed PMID: 20835304. Pubmed Central PMCID: 2930648.
125. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008 Sep;122(3):456-68; quiz 69-70. PubMed PMID: 18774381. Pubmed Central PMCID: 2693323.
126. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer research*. 2001 Jan 15;61(2):778-84. PubMed PMID: 11212282.
127. Thomas DD, Espey MG, Vitek MP, Miranda KM, Wink DA. Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: an alternative to the NO/O<sub>2</sub>- reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct 1;99(20):12691-6. PubMed PMID: 12226478. Pubmed Central PMCID: 130522.
128. Cobbs CS, Whisenhunt TR, Wesemann DR, Harkins LE, Van Meir EG, Samanta M. Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer research*. 2003 Dec 15;63(24):8670-3. PubMed PMID: 14695179.
129. Pino I, Pio R, Toledo G, Zabalegui N, Vicent S, Rey N, et al. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung cancer*. 2003 Aug;41(2):131-43. PubMed PMID: 12871776.
130. Bastian BC. Annexins in cancer and autoimmune diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1997 Jun;53(6):554-6. PubMed PMID: 9230935.

131. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007 May;131(5):1557-66. PubMed PMID: 17494805.
132. Wise SS, Holmes AL, Wise JP, Sr. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. *Reviews on environmental health*. 2008 Jan-Mar;23(1):39-57. PubMed PMID: 18557597.
133. Srivastava AN, Gupta A, Srivastava S, Natu SM, Mittal B, Negi MP, et al. Cisplatin combination chemotherapy induces oxidative stress in advance non small cell lung cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2010;11(2):465-71. PubMed PMID: 20843135.
134. Tsukioka T, Nishiyama N, Iwata T, Nagano K, Tei K, Suehiro S. Preoperative serum oxidative stress marker as a strong indicator of nodal involvement in clinical stage I lung adenocarcinoma. *International journal of clinical oncology*. 2012 Jun;17(3):250-5. PubMed PMID: 21748260.
135. Kim AW, Batus M, Myint R, Fidler MJ, Basu S, Bonomi P, et al. Prognostic value of xanthine oxidoreductase expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2011 Feb;71(2):186-90. PubMed PMID: 20570389.
136. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(17):1949-55. PubMed PMID: 19519435.
137. McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2013 Mar;12(3):217-28. PubMed PMID: 23449307.
138. Kundu N, Zhang S, Fulton AM. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 1995 Jan;13(1):16-22. PubMed PMID: 7820952.

139. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer treatment reviews*. 1997 Jul;23(4):209-40. PubMed PMID: 9377594.
140. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free radical biology & medicine*. 1990;8(1):15-9. PubMed PMID: 2157633.
141. Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy*. 1994 Jan-Feb;40(1):8-15. PubMed PMID: 8306820.
142. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993 May;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S. PubMed PMID: 8475889.
143. Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ, et al. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1998 Dec;9(12):1331-7. PubMed PMID: 9932164.
144. Esme H, Cemek M, Sezer M, Saglam H, Demir A, Melek H, et al. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology*. 2008 Jan;13(1):112-6. PubMed PMID: 18197920.
145. Ekhart C, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer treatment reviews*. 2009 Feb;35(1):18-31. PubMed PMID: 18771857.
146. Nair U, Bartsch H. Metabolic polymorphisms as susceptibility markers for lung and oral cavity cancer. *IARC scientific publications*. 2001;154:271-90. PubMed PMID: 11220667.
147. Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research*,

cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2003 Aug;12(8):689-98. PubMed PMID: 12917198.

148. Wu X, Lin J, Etzel CJ, Dong Q, Gorlova OY, Zhang Q, et al. Interplay between mutagen sensitivity and epidemiological factors in modulating lung cancer risk. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007 Jun 15;120(12):2687-95. PubMed PMID: 17290394.

149. Hung RJ, Baragatti M, Thomas D, McKay J, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, et al. Inherited predisposition of lung cancer: a hierarchical modeling approach to DNA repair and cell cycle control pathways. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2007 Dec;16(12):2736-44. PubMed PMID: 18086781.

150. Engels EA, Wu X, Gu J, Dong Q, Liu J, Spitz MR. Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer. *Cancer research*. 2007 Jul 1;67(13):6520-7. PubMed PMID: 17596594.

151. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):638-42. PubMed PMID: 18385739. Pubmed Central PMCID: 4539558.

152. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):633-7. PubMed PMID: 18385738.

153. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature genetics*. 2008 May;40(5):616-22. PubMed PMID: 18385676. Pubmed Central PMCID: 2713680.

154. Liu P, Vikis HG, Wang D, Lu Y, Wang Y, Schwartz AG, et al. Familial aggregation of common sequence variants on 15q24-25.1 in lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Sep 17;100(18):1326-30. PubMed PMID: 18780872. Pubmed Central PMCID: 2538550.
155. Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, et al. XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004 Jul 1;22(13):2594-601. PubMed PMID: 15173214.
156. Sun X, Li F, Sun N, Shukui Q, Baoan C, Jifeng F, et al. Polymorphisms in XRCC1 and XPG and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung cancer*. 2009 Aug;65(2):230-6. PubMed PMID: 19157633.
157. Qiu M, Yang X, Hu J, Ding X, Jiang F, Yin R, et al. Predictive value of XPD polymorphisms on platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(8):e72251. PubMed PMID: 23977265. Pubmed Central PMCID: 3747109.
158. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Neuberg DS, Wain JC, et al. Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Aug 1;10(15):4939-43. PubMed PMID: 15297394.
159. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 Mar 15;14(6):1797-803. PubMed PMID: 18347182.

160. Shiraishi K, Kohno T, Tanai C, Goto Y, Kuchiba A, Yamamoto S, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010 Nov 20;28(33):4945-52. PubMed PMID: 20940192.
161. Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, Souglakos J, Voutsina A, Georgoulas V, et al. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*. 2009 Mar;10(2):118-23. PubMed PMID: 19362955.
162. Yu D, Zhang X, Liu J, Yuan P, Tan W, Guo Y, et al. Characterization of functional excision repair cross-complementation group 1 variants and their association with lung cancer risk and prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 May 1;14(9):2878-86. PubMed PMID: 18451256.
163. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, Leon LG, D'Incecco A, Loosekoot N, et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012 Mar;23(3):670-7. PubMed PMID: 21652582.
164. Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, Lee JE, et al. Comprehensive analysis of UGT1A polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006 May 20;24(15):2237-44. PubMed PMID: 16636344.
165. Qian J, Gu S, Wu Q, Zhao X, Wu W, Gao Z, et al. Association of CASP7 polymorphisms and survival of patients with non-small cell lung cancer with platinum-based chemotherapy treatment. *Chest*. 2012 Sep;142(3):680-9. PubMed PMID: 22441531.

166. Dai J, Gu J, Lu C, Lin J, Stewart D, Chang D, et al. Genetic variations in the regulator of G-protein signaling genes are associated with survival in late-stage non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2011;6(6):e21120. PubMed PMID: 21698121. Pubmed Central PMCID: 3117866.
167. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*. 2009 Feb;35(1):32-46. PubMed PMID: 18774652.
168. Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung cancer*. 2007 Jul;57(1):1-25. PubMed PMID: 17337085.
169. Vineis P, Veglia F, Benhamou S, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, et al. CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003 May 1;104(5):650-7. PubMed PMID: 12594823.
170. Fujieda M, Yamazaki H, Saito T, Kiyotani K, Gyamfi MA, Sakurai M, et al. Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogenesis*. 2004 Dec;25(12):2451-8. PubMed PMID: 15308589.
171. Lorient MA, Rebuissou S, Oscarson M, Cenee S, Miyamoto M, Ariyoshi N, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics*. 2001 Feb;11(1):39-44. PubMed PMID: 11207029.
172. Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. Polymorphisms in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population. *Lung cancer*. 2001 Nov;34(2):177-83. PubMed PMID: 11679176.
173. Vineis P, Veglia F, Anttila S, Benhamou S, Clapper ML, Dolzan V, et al. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure,*

response, and susceptibility to chemicals. 2004 May-Jun;9(3):298-305. PubMed PMID: 15764294.

174. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Loidi L, Barros-Dios JM. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, tobacco and risk of lung cancer: a case-control study from Galicia, Spain. *Anticancer research*. 2003 Sep-Oct;23(5b):4333-7. PubMed PMID: 14666648.

175. Mohr LC, Rodgers JK, Silvestri GA. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anticancer research*. 2003 May-Jun;23(3A):2111-24. PubMed PMID: 12894585.

176. Schneider J, Bernges U, Philipp M, Woitowitz HJ. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer letters*. 2004 May 10;208(1):65-74. PubMed PMID: 15105047.

177. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer research*. 2000 Nov 15;60(22):6381-3. PubMed PMID: 11103801.

178. Ramanathan B, Jan KY, Chen CH, Hour TC, Yu HJ, Pu YS. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer research*. 2005 Sep 15;65(18):8455-60. PubMed PMID: 16166325.

179. Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer research*. 2010 Apr;30(4):1169-81. PubMed PMID: 20530424.

180. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 1998 May;19(5):711-21. PubMed PMID: 9635855.

181. Wang Z, Cook T, Alber S, Liu K, Kovesdi I, Watkins SK, et al. Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the

radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity. *Cancer research*. 2004 Feb 15;64(4):1386-95. PubMed PMID: 14973054.

182. Matsumoto H, Takahashi A, Ohnishi T. Nitric oxide radicals choreograph a radioadaptive response. *Cancer research*. 2007 Sep 15;67(18):8574-9. PubMed PMID: 17875696.

183. Tozer GM, Everett SA. Nitric oxide in tumor biology and cancer therapy. Part 2: Therapeutic implications. *Clinical oncology*. 1997;9(6):357-64. PubMed PMID: 9448964.

184. Zhang J, Li BS, Zhou CC, Yu HY, Ding XP, Sun MP, et al. Single nucleotide polymorphisms in NOS2A and NOS3 genes are not associated with treatment response of non-small cell lung cancer patients following the definitive radiochemotherapy. *Neoplasma*. 2012;59(6):631-40. PubMed PMID: 22862164.

185. Fujita S, Masago K, Hatachi Y, Fukuhara A, Hata A, Kaji R, et al. Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *BMC medical genetics*. 2010;11:167. PubMed PMID: 21114867. Pubmed Central PMCID: 3009637.

186. Grimminger PP, Maus MK, Schneider PM, Metzger R, Holscher AH, Sugita H, et al. Glutathione S-transferase PI (GST-PI) mRNA expression and DNA methylation is involved in the pathogenesis and prognosis of NSCLC. *Lung cancer*. 2012 Oct;78(1):87-91. PubMed PMID: 22884253.

187. Sawers L, Ferguson MJ, Ihrig BR, Young HC, Chakravarty P, Wolf CR, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *British journal of cancer*. 2014 Sep 9;111(6):1150-8. PubMed PMID: 25010864. Pubmed Central PMCID: 4453841.

188. Sun N, Sun X, Chen B, Cheng H, Feng J, Cheng L, et al. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung

- cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010 Feb;65(3):437-46. PubMed PMID: 19568750. Pubmed Central PMCID: 2797421.
189. Zhao M, Zhang Y, Cai W, Li J, Zhou F, Cheng N, et al. The Bim deletion polymorphism clinical profile and its relation with tyrosine kinase inhibitor resistance in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2014 Aug 1;120(15):2299-307. PubMed PMID: 24737648.
190. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature medicine*. 2012 Apr;18(4):521-8. PubMed PMID: 22426421.
191. Winther Larsen A, Nissen PH, Meldgaard P, Weber B, Sorensen BS. EGFR CA repeat polymorphism predict clinical outcome in EGFR mutation positive NSCLC patients treated with erlotinib. *Lung cancer*. 2014 Sep;85(3):435-41. PubMed PMID: 25017413.
192. Giordano CR, Mueller KL, Terlecky LJ, Krentz KA, Bollig-Fischer A, Terlecky SR, et al. A targeted enzyme approach to sensitization of tyrosine kinase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Experimental cell research*. 2012 Oct 1;318(16):2014-21. PubMed PMID: 22687878. Pubmed Central PMCID: 3858180.
193. Xu Y, Pan Q, Wang C, He C, Su Z, Guo X, et al. Genetic polymorphisms in oxidative stress-related genes are associated with clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. *American journal of cancer research*. 2014;4(6):934-42. PubMed PMID: 25520881. Pubmed Central PMCID: 4266725.
194. Goto I, Yoneda S, Yamamoto M, Kawajiri K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer research*. 1996 Aug 15;56(16):3725-30. PubMed PMID: 8706015.

195. Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2003 Jun;12(6):527-33. PubMed PMID: 12814998.
196. Gonlugur U, Pinarbasi H, Gonlugur TE, Silig Y. The association between polymorphisms in glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and lung cancer outcome. *Cancer investigation*. 2006 Aug-Sep;24(5):497-501. PubMed PMID: 16939958.
197. Lu C, Spitz MR, Zhao H, Dong Q, Truong M, Chang JY, et al. Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2006 Jan 15;106(2):441-7. PubMed PMID: 16342067.
198. Ada AO, S CK, Hancer F, Bilgen S, Suzen SH, Alpar S, et al. CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. *Neoplasma*. 2010;57(6):512-21. PubMed PMID: 20845989.
199. Rodrigues P, Furriol J, Bermejo B, Chaves FJ, Lluch A, Eroles P. Identification of candidate polymorphisms on stress oxidative and DNA damage repair genes related with clinical outcome in breast cancer patients. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(12):16500-13. PubMed PMID: 23443115. Pubmed Central PMCID: 3546704.
200. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 Feb 2;92(3):205-16. PubMed PMID: 10655437.

201. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928-9. PubMed PMID: 16720584. Epub 2006/05/25. eng.
202. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol*. 2004 Oct;53(5):793-808. PubMed PMID: 15545256. Epub 2004/11/17. eng.
203. Trujillano J, Sarria-Santamera A, Esquerda A, Badia M, Palma M, March J. [Approach to the methodology of classification and regression trees]. *Gaceta sanitaria / SESPAS*. 2008 Jan-Feb;22(1):65-72. PubMed PMID: 18261446. Aproximacion a la metodologia basada en arboles de decision (CART). Mortalidad hospitalaria del infarto agudo de miocardio.
204. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians. 2012 Jul-Aug;62(4):220-41. PubMed PMID: 22700443.
205. Escuin JS. [Lung cancer in Spain. Current epidemiology, survival, and treatment]. *Archivos de bronconeumologia*. 2009 Jul;45(7):341-8. PubMed PMID: 19324488. El cancer de pulmon en Espana. Epidemiologia, supervivencia y tratamiento actuales.
206. Estrada Trigueros G, Comeche L, Lopez Encuentra A, Montoro Zulueta J, Gonzalez Garrido F, Colina F. [Bronchogenic carcinoma 2000-2001: characteristics and overall survival]. *Archivos de bronconeumologia*. 2007 Nov;43(11):594-8. PubMed PMID: 17983542. Carcinoma broncogenico 2000-2001: caracteristicas y supervivencia global.
207. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *The Lancet Oncology*. 2007 Sep;8(9):773-83. PubMed PMID: 17714991.

208. Debevec L, Debeljak A. Outcomes of unselected routinely treated lung cancer patients. *Lung cancer*. 2008 Jan;59(1):140-1. PubMed PMID: 18023498.
209. Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, et al. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2714-21. PubMed PMID: 8839867.
210. Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT. Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Aug 7;203(8):1927-37. PubMed PMID: 16880254. Pubmed Central PMCID: 2118373.
211. Suh CI, Stull ND, Li XJ, Tian W, Price MO, Grinstein S, et al. The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during Fcγ<sub>3</sub> receptor-induced phagocytosis. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Aug 7;203(8):1915-25. PubMed PMID: 16880255. Pubmed Central PMCID: 2118377.
212. Zhang C, Lan T, Hou J, Li J, Fang R, Yang Z, et al. NOX4 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis through positive feedback regulation of PI3K/Akt signaling. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4392-405. PubMed PMID: 24946933. Pubmed Central PMCID: 4147332.
213. Li J, Lan T, Zhang C, Zeng C, Hou J, Yang Z, et al. Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Jan 20;6(2):1031-48. PubMed PMID: 25504436. Pubmed Central PMCID: 4359215.
214. Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K, et al. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-β-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *American journal of*

physiology *Renal physiology*. 2005 Oct;289(4):F816-25. PubMed PMID: 16159901. Pubmed Central PMCID: 1460011.

215. Stallings-Mann ML, Waldmann J, Zhang Y, Miller E, Gauthier ML, Visscher DW, et al. Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression. *Science translational medicine*. 2012 Jul 11;4(142):142ra95. PubMed PMID: 22786680. Pubmed Central PMCID: 3733503.

216. Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Bao L, Messer K, Ideker T, et al. Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. *PLoS one*. 2014;9(4):e95893. PubMed PMID: 24770346. Pubmed Central PMCID: 4000195.

217. Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L, Haigis KM, Bender Kim CF, Sweet-Cordero A, et al. Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer research*. 2007 Sep 1;67(17):8089-94. PubMed PMID: 17804720.

218. Jajoo S, Mukherjea D, Watabe K, Ramkumar V. Adenosine A(3) receptor suppresses prostate cancer metastasis by inhibiting NADPH oxidase activity. *Neoplasia*. 2009 Nov;11(11):1132-45. PubMed PMID: 19881949. Pubmed Central PMCID: 2767215.

219. Yan S, Liu G, Pei C, Chen W, Li P, Wang Q, et al. Inhibition of NADPH oxidase protects against metastasis of human lung cancer by decreasing microRNA-21. *Anti-cancer drugs*. 2015 Apr;26(4):388-98. PubMed PMID: 25563770.

220. Kim YM, Cho M. Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells. *Cellular signalling*. 2014 Apr;26(4):784-96. PubMed PMID: 24378533.

221. Ryan BM, Zanetti KA, Robles AI, Schetter AJ, Goodman J, Hayes RB, et al. Germline variation in NCF4, an innate immunity gene, is associated with an increased risk of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal*

international du cancer. 2014 Mar 15;134(6):1399-407. PubMed PMID: 23982929. Pubmed Central PMCID: 3947351.

222. Mizuno H, Kitada K, Nakai K, Sarai A. PrognScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. BMC medical genomics. 2009;2:18. PubMed PMID: 19393097. Pubmed Central PMCID: 2689870.

223. Lee EB, Jeon HS, Yoo SS, Choi YY, Kang HG, Cho S, et al. Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer. Annals of surgical oncology. 2010 Oct;17(10):2608-18. PubMed PMID: 20422457.

224. Kim M, Kang HG, Lee SY, Lee HC, Lee EB, Choi YY, et al. Comprehensive analysis of DNA repair gene polymorphisms and survival in patients with early stage non-small-cell lung cancer. Cancer science. 2010 Nov;101(11):2436-42. PubMed PMID: 20731661.

225. Jeon HS, Jin G, Kang HG, Choi YY, Lee WK, Choi JE, et al. A functional variant at 19q13.3, rs967591G>A, is associated with shorter survival of early-stage lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013 Aug 1;19(15):4185-95. PubMed PMID: 23775331.

226. Kim MJ, Kang HG, Lee SY, Jeon HS, Lee WK, Park JY, et al. AKT1 polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. Journal of surgical oncology. 2012 Feb;105(2):167-74. PubMed PMID: 21842521.

227. Yoo SS, Choi JE, Lee WK, Choi YY, Kam S, Kim MJ, et al. Polymorphisms in the CASPASE genes and survival in patients with early-stage non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009 Dec 1;27(34):5823-9. PubMed PMID: 19826114.

228. Lomnytska MI, Becker S, Bodin I, Olsson A, Hellman K, Hellstrom AC, et al. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. British journal of cancer.

2011 Jan 4;104(1):110-9. PubMed PMID: 21119665. Pubmed Central PMCID: 3039821.

229. Italiano D, Lena AM, Melino G, Candi E. Identification of NCF2/p67phox as a novel p53 target gene. *Cell cycle*. 2012 Dec 15;11(24):4589-96. PubMed PMID: 23187810. Pubmed Central PMCID: 3562304.

230. Wang Y, Chen F, Le B, Stepp DW, Fulton DJ. Impact of Nox5 polymorphisms on basal and stimulus-dependent ROS generation. *PloS one*. 2014;9(7):e100102. PubMed PMID: 24992705. Pubmed Central PMCID: 4081039.

231. Lin J, Xu P, LaVallee P, Hoidal JR. Identification of proteins binding to E-Box/Ku86 sites and function of the tumor suppressor SAFB1 in transcriptional regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Oct 31;283(44):29681-9. PubMed PMID: 18772145. Pubmed Central PMCID: 2573066.

232. Linder N, Haglund C, Lundin M, Nordling S, Ristimaki A, Kokkola A, et al. Decreased xanthine oxidoreductase is a predictor of poor prognosis in early-stage gastric cancer. *Journal of clinical pathology*. 2006 Sep;59(9):965-71. PubMed PMID: 16935971. Pubmed Central PMCID: 1860491.

233. Linder N, Martelin E, Lundin M, Louhimo J, Nordling S, Haglund C, et al. Xanthine oxidoreductase - clinical significance in colorectal cancer and in vitro expression of the protein in human colon cancer cells. *European journal of cancer*. 2009 Mar;45(4):648-55. PubMed PMID: 19112016.

234. Liu TQ, Wang GB, Li ZJ, Tong XD, Liu HX. Silencing of Rac3 inhibits proliferation and induces apoptosis of human lung cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(7):3061-5. PubMed PMID: 25854406.

235. Ryk C, Hou SM, Pershagen G, Wiklund NP, Nyberg F, de Verdier PJ. The (CCTTT)<sub>n</sub> microsatellite polymorphism in the NOS2 gene may influence lung cancer risk and long-term survival, especially in non-smokers. *Tumour biology* :

the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014 May;35(5):4425-34. PubMed PMID: 24408018.

236. Mortensen K, Holck S, Christensen IJ, Skouv J, Hougaard DM, Blom J, et al. Endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels is a favorable prognostic indicator in premenopausal breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999 May;5(5):1093-7. PubMed PMID: 10353743.

237. Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010 Mar 17;30(11):3933-46. PubMed PMID: 20237264.

238. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, et al. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free radical research*. 2011 Sep;45(9):1033-9. PubMed PMID: 21682664.

239. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, Rybak LP. Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxidants & redox signaling*. 2010 Sep 1;13(5):589-98. PubMed PMID: 20214492. Pubmed Central PMCID: 2935347.

240. Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Sep 9;280(36):31859-69. PubMed PMID: 15994299.

241. Hung CC, Chien CY, Chiang WF, Lin CS, Hour TC, Chen HR, et al. p22phox confers resistance to cisplatin, by blocking its entry into the nucleus. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):4110-25. PubMed PMID: 25686830. Pubmed Central PMCID: 4414176.

242. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 Dec;6(12):4739-44. PubMed PMID: 11156228.

243. Matsunaga T, Yamaji Y, Tomokuni T, Morita H, Morikawa Y, Suzuki A, et al. Nitric oxide confers cisplatin resistance in human lung cancer cells through upregulation of aldo-keto reductase 1B10 and proteasome. *Free radical research*. 2014 Nov;48(11):1371-85. PubMed PMID: 25156503.

# MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla. Distribución de los polimorfismos según el tipo histológico de cáncer de pulmón						
	No microcítico (N=180)		Microcítico (N=39)		OR (95%CI)	Modelo
Polimorfismo	N	%	N	%		P
<i>NCF2_rs2274064</i> (v.p.=16)						
TT	51	30,4	12	34,3	1,26	N.S.
CT	85	50,6	15	42,9	(0,52-3,03)	0,61
CC	32	19	8	22,9		R
<i>NCF4_rs2072712</i> (v.p.=6)						
CC	136	77,7	33	86,8	0,53	N.S.
CT	39	22,3	5	13,2	(0,19-1,44)	0,19
						D*
<i>NCF4_rs2075939</i> (v.p.=6)						
CC	125	71,8	26	66,7	4,65	N.S.
CT	47	27,0	11	28,2	(0,63-34,07)	0,15
TT	2	1,1	2	5,1		R
<i>NOX3_rs12195525</i> (v.p.=7)						
GG	139	79,9	26	68,4	1,97	N.S.
GT	33	19,0	12	31,6	(0,90-4,31)	0,097
TT	2	1,1	0	0,0		OD
<i>NOX3_rs231954</i> (v.p.=18)						
TT	64	39,0	11	29,7	1,51	N.S.
TC	71	43,3	19	51,4	(0,90-4,31)	0,28
CC	29	17,7	7	18,9		D
<i>NOX3_rs34960420</i> (v.p.= 7)						
GG	141	80,6	26	70,3	1,89	N.S.
GA	32	18,3	11	29,7	(0,85-4,22)	0,13
AA	2	1,1	0	0,0		OD
<i>NOX5_rs2277552</i> (v.p.=15)						
CC	160	95,2	33	91,7	1,82	N.S.
CT	8	4,8	3	8,3	(0,46-7,22)	0,42
						D
<i>NOX5_rs12907196</i> (v.p.=6)						
CC	42	24,0	10	26,3	1,13	N.S.
CT	78	44,6	16	42,1	(0,51-2,52)	0,76
TT	55	31,4	12	31,6		R
<i>XDH_rs17011368</i> (v.p.=4)						
TT	148	84,1	36	92,3	0,44	N.S.
CT	28	15,9	3	7,7	(0,13-1,53)	0,16
						D*

<i>XDH_rs1884725</i> (v.p.=4)						
GG	87	49,4	26	66,7	<b>0,42</b> <b>(0,19-0,92)</b>	<b>0.024</b> <b>OD</b>
GA	79	44,9	10	25,6		
AA	10	5,7	3	7,7		
<i>NOS2_rs2297518</i> (v.p.=20)						
GG	116	71,2	23	63,9	3,14 (0,50-19,50)	N.S 0,25 R
GA	44	27	11	30,6		
AA	3	1,8	2	5,6		
<i>NOS2_rs1060826</i> (v.p.=3)						
GG	51	28,8	7	17,9	1,73 (0,84-3,54)	N.S 0,13 OD
GA	90	50,8	25	64,1		
AA	36	20,3	7	17,9		
<i>RAC2_rs2239774</i> (v.p.=7)						
GG	120	69,4	26	66,7	1,16 (0,54-2,47)	N.S 0,71 OD
GC	48	27,7	12	30,8		
CC	5	2,9	1	2,6		
<i>RAC2_rs1064498</i> (v.p.=18)						
TT	108	65,9	27	73,0	0,00 (0,00-NA)	N.S. 0,2 R
CT	52	31,7	10	27,0		
CC	4	2,4	0	0,0		
Modelo: A: aditivo, R: recesivo, D: dominante. OR: odds ratio						



