



**EXPRESIÓN Y SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE
MARCADORES DE CÉLULA MADRE EN
CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULA NO
PEQUEÑA EN ESTADIOS INICIALES**



TESIS DOCTORAL

Autora: Paula A. Toro Soto

Directores: Dr. F. Ignacio Aranda López
Dra. M. Concepción Martín Serrano

Alicante, 2017



Dr. D. F. IGNACIO ARANDA LÓPEZ y Dra. Dña. CONCEPCIÓN
MARTÍN SERRANO, como Directores de Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo "*Expresión y significado pronóstico de marcadores de célula madre en carcinoma pulmonar de célula no pequeña en estadios iniciales*" realizado por Dña. PAULA TORO SOTO ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a 29 de junio de 2017.

Fdo.

Dr. D. F. IGNACIO ARANDA LÓPEZ

Director Tesis Doctoral

Dra. Dña. CONCEPCIÓN MARTÍN SERRANO

Co-Directora Tesis Doctoral



D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del Departamento
de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo "*Expresión y significado pronóstico de marcadores de célula madre en carcinoma pulmonar de célula no pequeña en estadios iniciales*" presentado por Dña. PAULA TORO SOTO bajo la dirección del Dr. D. F. IGNACIO ARANDA LÓPEZ y de la Dra. Dña. CONCEPCIÓN MARTÍN SERRANO.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 29 de junio de 2017.

Prof. J. Fernández

Director

Dpto. Medicina Clínica

Agradecimientos

Esta tesis no habría sido posible sin la participación de un grupo de personas que más allá de su trabajo, se implicaron de manera excepcional: Fany Rojas, Técnico de AP e imprescindible apoyo desde el día uno. Gracias a Fany se construyeron los TMAs y se pusieron a punto los anticuerpos. Ha controlado el proceso técnico en todas sus etapas y gracias a su ayuda, los resultados de las técnicas de inmunohistoquímicas han sido impecables.

Cristina Alenda, Patóloga, Directora Científica del Biobanco del Hospital General de Alicante (HGUA). Motor vital en el impulso de proyectos de investigación en el Servicio. Generadora de ideas y sobretodo, de apoyo y colaboración.

Concha Martín, Neumóloga, Jefa del Servicio de Neumología del HGUA y co-directora de esta tesis. Su participación y sus aportes a este trabajo lo hacen de interés multidisciplinar, extendiéndose más allá del ámbito de la Anatomía Patológica.

Carlos Gálvez, Cirujano Torácico, incansable compañero de tesis. Carlos realizó la búsqueda de información clínica de cada uno de los pacientes incluidos y se ha encargado del mantenimiento de la base de datos. Sin su participación, no existiría este proyecto.

Ignacio Aranda, Patólogo, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del HGUA y Director de tesis. Promotor de la idea que originó este trabajo y partícipe en su elaboración. Su experiencia y conocimientos enriquecieron las diferentes fases de este proyecto, imposible de pensar sin su acompañamiento.

Dedicatoria

Todo tiene su momento oportuno. Y ahora me corresponde agradecer a la vida por las personas que me rodean:

A mi mamá, Lucy, por darme alas. Gracias por oírme, y abrazarme y animarme. Gracias a ella crecí convencida de ser capaz de todo.

Gracias a mis hermanos, Juan y Javier. Además de ejemplos de vida y de trabajo, me han acompañado y apoyado siempre. La vida ha sido infinitamente más divertida a su lado.

Interminables gracias a mis dos hijos, Juan Andrés y Santiago, que son mi alma entera. Le dan motivos a mi existencia. Hacen que siempre sea tiempo para reír, abrazarse y saltar de gusto.

Para Ignacio, gracias con todo mi corazón. Ha sido el mayor regalo que la vida me ha dado. Teniéndolo a mi lado, todo es posible.

Abreviaturas

AC: Anticuerpos

ACA: Adenocarcinoma

ALDH: Aldehido Deshidrogenasa

ALK: Anaplastic lymphoma kinase

ATS: Association of Thoracic Surgery

CCE: Carcinoma de células escamosas

CCP: Carcinoma de célula pequeña

CD: Cluster of differentiation

CGA: Campos de gran aumento

CPCNP: Carcinoma de pulmón de célula no pequeña

CMC: Células madre cancerosas

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ERS: European Respiratory Society

FDA: Food and Drug Administration

H&E: Hematoxilina Eosina

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

ITK: Inhibidores de tirosin kinasa

IHQ: Inmunohistoquímica

PD-1: Programmed Death 1

PD-L1: Programmed Death Ligand 1

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SNC: Sistema nervioso central

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (del inglés, *Real time polymerase chain reaction*)

TC: Tomografía computarizada

TICs: Células iniciadoras tumorales (del inglés, *Tumor initiating cells*)



Índice

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Epidemiología del cáncer de pulmón	9
1.2 Carcinoma pulmonar de célula no pequeña	15
1.2.1 Consideraciones generales	15
1.2.2 Clasificación molecular	18
1.2.3 Implicaciones terapéuticas	22
1.3 Patogénesis y heterogeneidad tumoral	24
1.4 Teoría de las Células Madre Cancerosas	29
1.5 CMCs y pulmón	30
1.5.1 CD44	32
1.5.2 CD44v	34
1.5.3 CD24	36
1.5.4 ALDH1	37
1.5.5 SOX2	40
1.5.6 CD133	41
1.6 Identificación y cuantificación de Células Madre	43
1.6.1 Estudio del nivel de actividad	44
1.6.2 Métodos de detección de expresión de proteínas	44

2. JUSTIFICACIÓN	47
-------------------------	-----------

3. HIPÓTESIS	51
---------------------	-----------

4. OBJETIVOS **55**

4.1 Objetivo principal 55

4.2 Objetivos secundarios 55

5. MATERIALES Y MÉTODOS **59**

5.1 Tipo de estudio 59

5.2 Selección de casos 59

5.3 Muestra 60

5.4 Variables a estudio 60

 5.4.1 De identificación y clínicas 60

 5.4.2 Variables morfológicas convencionales 60

 5.4.3 Variables inmunohistoquímicas 65

5.5 Construcción de las matrices de tejido 66

5.6 Aplicación de técnicas inmunohistoquímicas 67

5.7 Valoración de inmunohistoquímica 68

 5.7.1 Valoración de marcadores de expresión de células madre 68

 5.7.2 Valoración de marcadores de diferenciación histológica 71

 5.7.3 Valoración de marcadores de proliferación celular 72

 5.7.4 Valoración de expresión de p53 72

5.8 Variables de resultado 72

5.9 Análisis de datos 72

 5.9.1 Estudio descriptivo 72

 5.9.2 Análisis univariante de supervivencia 73

5.10 Medios disponibles y financiación 73

5.11 Dificultades y limitaciones 74

5.12 Aspectos éticos 74

6. RESULTADOS	77
6.1 Análisis descriptivo de variables clínico-patológicas	77
6.1.1 Distribución por tipos histológicos	82
6.1.2 Variables relacionadas con proliferación celular	82
6.2 Análisis descriptivo de la expresión IHQ de marcadores de células madre	82
6.2.1 CD44	83
6.2.2 CD44v	87
6.2.3 CD24	91
6.2.4 ALDH1	96
6.2.5 SOX2	101
6.2.6 CD133	105
6.3 Análisis de correlación entre variables	109
6.4 Análisis de supervivencia	110
6.4.1 CD44	110
6.4.2 CD44v	110
6.4.3 CD24	111
6.4.4 ALDH1	113
6.4.5 SOX2	114
6.4.6 CD133	114
6.4.7 Análisis de Supervivencia y relación CD44/CD24	115
6.4.8 Análisis de Supervivencia y relación con otras variables	117

7. DISCUSIÓN	121
7.1 Expresión de CD44 y CD44v	121
7.1.1 Expresión de CD44 e isoformas y distribución por tipos histológicos	122
7.1.2 Expresión de CD44 e isoformas y relación con supervivencia	122

7.2 Expresión de CD24	125
7.2.1 Expresión de CD24 y distribución por tipos histológicos	127
7.2.2 Expresión de CD24 y relación con supervivencia	127
7.3 Expresión de ALDH	129
7.3.1 Expresión de ALDH1 y distribución por tipos histológicos	130
7.3.2 Expresión de ALDH1 y relación con supervivencia	130
7.4 Expresión de SOX2	132
7.4.1 Expresión de SOX2 y distribución por tipos histológicos	134
7.4.2 Expresión de SOX2 y relación con supervivencia	134
7.5 Expresión de CD133	136
7.5.1 Expresión de CD133 y distribución por tipos histológicos	136
7.5.2 Expresión de CD133 y relación con supervivencia	137
7.6 Correlación entre expresión simultánea de marcadores	138
7.7 Limitaciones	141



8. CONCLUSIONES

145

9. REFERENCIAS

149

ÍNDICE DE FIGURAS

165

ÍNDICE DE TABLAS

171

ANEXOS

177

ANEXO I Hoja de recolección de variables

ANEXO II Póster XXVIII Congreso Nacional de Anatomía Patológica

ANEXO III Comunicación aceptada como póster 29th European Congress of Pathology





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer de pulmón

El crecimiento de la población y su envejecimiento se reflejan en el número de casos nuevos de cáncer que se diagnostican cada año. En 2012 la incidencia de cáncer en España fue de 215.534 casos (1), mientras que el riesgo de presentar cáncer antes de los 75 años alcanzaba el 25,1% (2). Para 2020, la cifra estimada de casos nuevos será de 246.713, distribuidos en 97.715 mujeres y 148.998 hombres (proyecciones obtenidas por el proyecto GLOBOCAN a partir de la revisión para 2012) (**Figura 1**) (1).

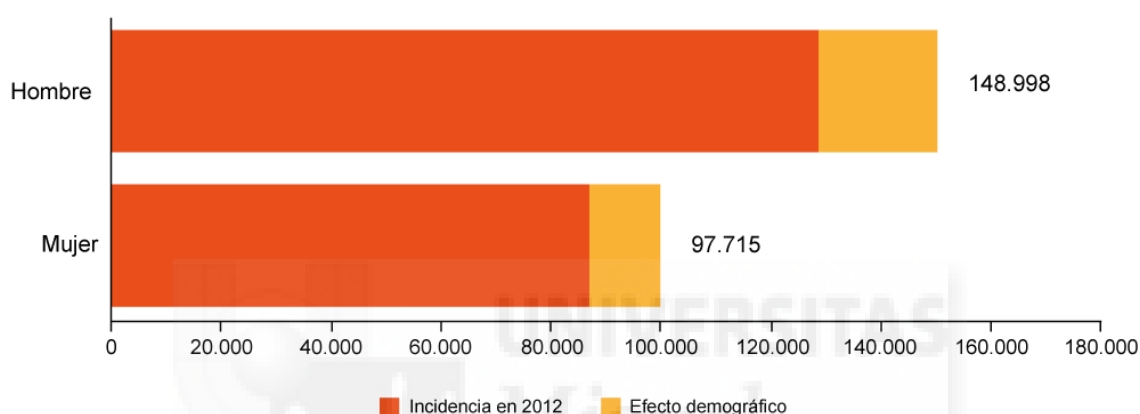


Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en España para 2020 (todos los tipos de cáncer, excluyendo tumores cutáneos no melanoma).

Fuente: "Las cifras del cáncer en España 2016". SEOM. Disponible en: <http://www.seom.org> (1).

Del total de casos diagnosticados en España, la próstata en el hombre y la mama en la mujer son los órganos más frecuentemente afectados (**Tabla 1**) (1), siendo el pulmón el segundo en frecuencia en hombres y el cuarto en mujeres (total de 26.715 nuevos casos de cáncer de pulmón diagnosticados en España en 2012, 12,4% del total de tumores de nuevo diagnóstico en el mismo año).

Respecto a la mortalidad, en 2012 el número de muertes fue de 102.762 casos. La predicción para 2020 es de 117.859 (1); según datos de la Red Española de Registros de Cáncer, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del aparato circulatorio en la población general española y la primera causa de muerte en hombres (3 de cada 10 muertes en varones y 2 de cada 10 muertes en mujeres).

Tabla 1. Tumores más frecuentes en España y distribución por sexo (2012)

Frecuencia	Hombres	Mujeres	Ambos sexos
1	Próstata	Mama	Colorrectal
2	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3	Colorrectal	Útero	Pulmón
4	Vejiga	Pulmón	Mama
5	Estómago	Ovario	Vejiga

Fuente: “Las cifras del cáncer en España 2016”. SEOM. Disponible en: <http://www.seom.org> (1).

El panorama en España es similar a lo observado a nivel mundial y la mayoría de muertes por cáncer corresponden a un origen pulmonar (1) (**Figura 2**).

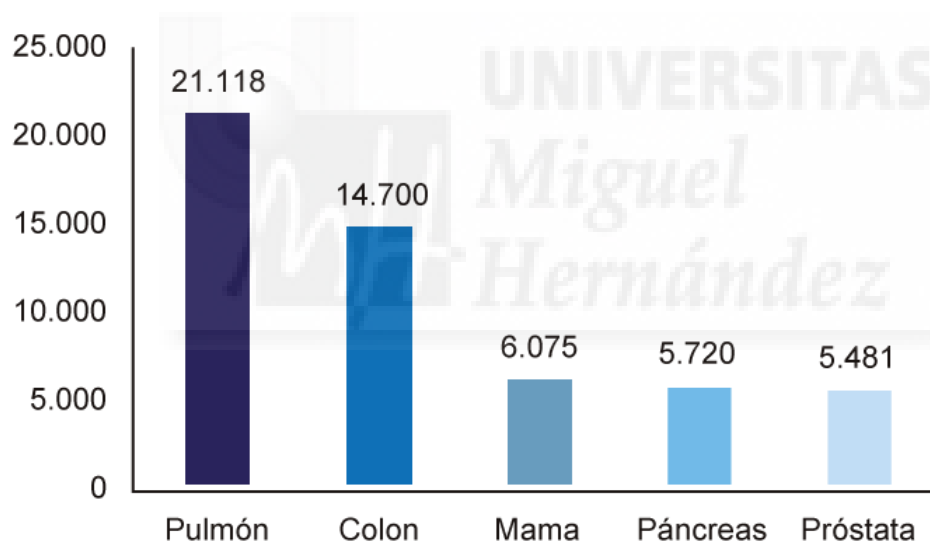


Figura 2. Muertes en España por causas oncológicas en 2012.

Fuente: “Las cifras del cáncer en España 2016”. SEOM. Disponible en: <http://www.seom.org> (1).

El cáncer de pulmón es el tumor de mayor incidencia (13%) y mortalidad (19,4%) en nuestro país con cifras absolutas en aumento (**Tabla 2**) (2). En la Comunidad Valenciana el número de afectados por año es de cerca de 2.200, siendo la cuarta autonomía en el país con mayor número de muertes por cáncer de pulmón (2).

Tabla 2. Muertes por cáncer de pulmón en España. Evolución 1980-2005

Sexo	1980	1985	1990	1995	2000	2005
Hombres	7597	10085	12662	14931	15477	16645
Mujeres	1174	1264	1320	1579	1886	2470
Total	8771	11349	13982	16510	17363	19115
Radio hombre / mujer	6,5	7,9	9,6	9,4	8,2	6,7

Fuente: Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/>) (2)

A nivel mundial, si bien las tasas ajustadas de cáncer pulmonar en varones han disminuido (3), la incidencia en mujeres ha aumentado, sobrepasando actualmente al cáncer de mama y estableciéndose como primera causa de muerte por cáncer en mujeres de países desarrollados (1, 4-6) (**Tabla 3**).

Pese a que en España la incidencia de cáncer de pulmón en mujeres es una de las más bajas del mundo, a partir de 1990, las cifras en este grupo poblacional han sufrido uno de los mayores incrementos globales, probablemente explicado por el pico relativo tardío del aumento en el consumo de tabaco por mujeres españolas (acrecentado entre 1960 y 1990) (5).

Tabla 3. Cáncer de pulmón: situación global, 2016 (1, 4-6)

<i>Muertes en mujeres</i> Países en vía de desarrollo Países desarrollados	281.000 (<i>versus</i> 324.300 por cáncer de mama) 209.900 (<i>versus</i> 197.600 por cáncer de mama)
<i>Casos nuevos a nivel mundial</i>	1,8 millones (13% del total de neoplasias de nuevo diagnóstico)
<i>Costo de detección y tratamiento</i> (Estados Unidos, 2007)	Superior a 5000 millones de dólares

Debido a su alta tasa de mortalidad (ratio mortalidad / incidencia de 0,87) (7) y a la relativa baja variabilidad en la supervivencia en diferentes regiones, el patrón geográfico de mortalidad se superpone al de incidencia (8) (**Figura 3**).

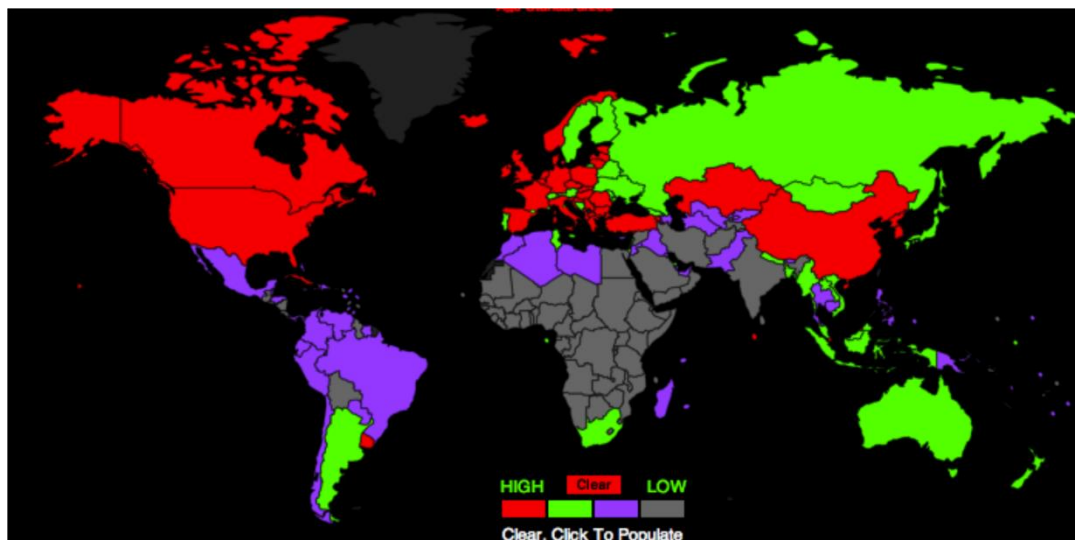


Figura 3. Variabilidad geográfica en tasa de mortalidad por cáncer de pulmón. Las mayores tasas de mortalidad se encuentran en regiones señaladas en rojo, con disminuciones progresivas (verde, lila y gris).

En el mundo, las mayores tasas de incidencia se observan en hombres en Estados Unidos en población afroamericana, así como en países del Europa del Este, mientras que regiones como Africa, América Central, Suramérica y Asia Central y Sur, tienen cifras significativamente inferiores. La distribución geográfica en mujeres es similar; en China la incidencia observada tanto en hombres como en mujeres supera a la de muchos países europeos (9).

Las variaciones geográficas en la prevalencia del cáncer de pulmón se corresponden con las diferencias observadas en el consumo de tabaco y su magnitud. En hombres, el 85% a 90% de casos están relacionados con el tabaquismo, y por esto, en países en que se han implementado programas de control del consumo de tabaco, la mortalidad atribuible a estos tumores ha disminuido. En contraste, en regiones donde la epidemia del consumo de tabaco es más reciente y continúa aún en incremento (China, Corea, algunos países africanos), las tasas de muerte por cáncer pulmonar están aumentando.

La exposición ambiental a sustancias diferentes al tabaco (asbesto, metales – cromo, cadmio, arsénico-, químicos orgánicos, radiación, contaminación ambiental, humo de carbón) también explica las diferencias regionales en las tasas observadas (10, 11); lo anterior permite entender por qué mujeres chinas, pese a su baja prevalencia en consumo de tabaco tienen mayores tasas de incidencia que aquellas de países europeos (12).

Si bien todos los subtipos histológicos de carcinomas pulmonares guardan relación con el tabaquismo, la asociación más fuerte se observa en el grupo de carcinomas de células escamosas (CCE) y carcinomas de célula pequeña (CCP), originados predominantemente en vías aéreas centrales (13).

En las últimas décadas se ha constatado un cambio en la incidencia según subtipos histológicos, con un decline progresivo de CCE y CCP, e incremento en el número de adenocarcinomas (ACA), que constituye actualmente el tipo más prevalente de cáncer de pulmón (13). Tales modificaciones al parecer guardan relación con los cambios introducidos por la industria del tabaco en cuanto a la composición de los cigarrillos (menor contenido en alquitrán y nicotina), así como con cambios en los hábitos poblacionales en cuanto al consumo (tendencia de los fumadores a fumar más frecuentemente y con inhalaciones más profundas para lograr mayor efecto), con mayor depósito de carcinógenos en la periferia pulmonar.

Además de medidas educativas para prevenir y disminuir el tabaquismo, se buscan alternativas de detección precoz, mediante básicamente, tomografía computarizada (TC) en espiral. Según el Ensayo de Detección de Cáncer de Pulmón, desarrollado por el Instituto Nacional de Cáncer norteamericano, su implementación podría suponer una reducción del 16% a 20% en el número de muertes por cáncer de pulmón en fumadores de más de 30 años/paquete (en comparación con el cribaje basado en radiografía) (14).

Pese a los múltiples avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados, así como a un diagnóstico más temprano y nuevas alternativas de tratamiento, en los últimos 20 años sólo ha sido posible disminuir en 6% la tasa de mortalidad por lo que, actualmente la tasa de supervivencia global a 5 años es de 16% para tumores en todos los estadios (15, 16).

Del total de casos diagnosticados, sólo 15-20% son susceptibles de tratamiento quirúrgico, tras el cual, el riesgo de recaídas loco-regionales y a distancia es alto (22%-30% para tumores en estadio IA, con supervivencia global (SG) a 5 años de 73%). Para casos en estadio IB, la SG disminuye a 58% (15) (**Figura 4**).

Si bien en estadios más avanzados (II y III), la terapia con cisplatino aporta un incremento de 5% en la supervivencia, dicho beneficio no es claro (al menos no en la totalidad) en tumores en estadio I e incluso el tratamiento adyuvante en este contexto podría ser perjudicial.

Proposed T Categories

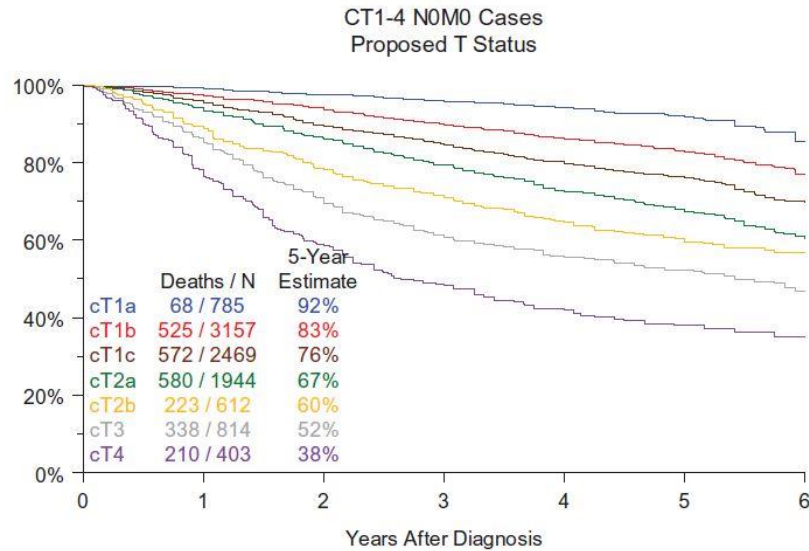


Figura 4. Supervivencia a 5 años de acuerdo a la 8ª edición TNM con subclasificación del tamaño (T) para tumores T1-T4N0M0 (17).

La mayoría de pacientes con cáncer pulmonar experimentan progresión de su enfermedad y recaídas, que conducen a menor supervivencia (16). Actualmente la medicina personalizada ha cambiado el paradigma terapéutico (7), especialmente en el grupo de ACA, y la inmunoterapia como alternativa de segunda línea en casos avanzados ha logrado éxito en reducir las tasas de mortalidad (18).

Sin embargo, no todos los pacientes se benefician de estas nuevas opciones terapéuticas. La tasa de respuesta a tratamientos dirigidos con anticuerpos anti PD-1 y PD-L1 en poblaciones sin seleccionar, es de 15%-20% (18), lo que señala la necesidad de identificar biomarcadores que permitan una más adecuada selección de pacientes.

En general, el pronóstico en el 60% de casos de carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP) es malo (4) y se asocia con una supervivencia global a 5 años de 14% (5).

1.2 Carcinoma pulmonar de célula no pequeña

1.2.1 *Consideraciones generales:* Dentro del conjunto de neoplasias pulmonares la mayoría corresponde a tumores epiteliales y entre estos, el CPCNP representa entre 85% a 90% del total de casos (16).

El CPCNP constituye un conjunto heterogéneo de tumores en el que se incluyen carcinomas con diversas características clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares; debido a la ausencia de opciones terapéuticas (más allá de la quimioterapia convencional), el CPCNP hasta fechas recientes fue considerado como una “única” entidad desde el punto de vista terapéutico. Sin embargo, tras ponerse de manifiesto cómo tumores con histología diferente respondían de manera diversa a algunos medicamentos, es evidente que la clasificación actual debe integrar parámetros morfológicos y moleculares (19) (**Figura 5**).

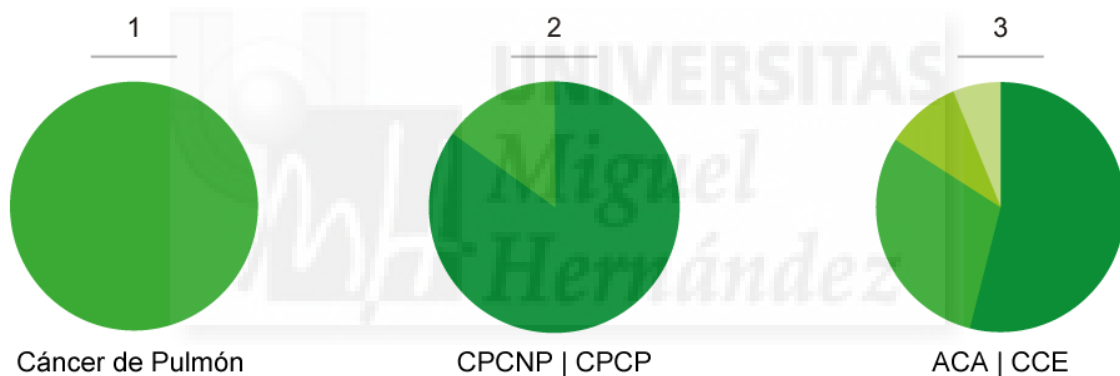


Figura 5. Evolución de la clasificación histológica de los tumores pulmonares. (1) Concepción inicial de un grupo “único” sin diferencias relevantes a efectos terapéuticos. (2) Diferenciación entre CPCNP y CPCP. (3) Subtipos histológicos de CPCNP, con relevancia pronóstica y terapéutica.

CPCNP: Carcinoma pulmonar de célula no pequeña; CPCP: Carcinoma pulmonar de célula pequeña; ACA: Adenocarcinoma; CCE: Carcinoma de células escamosas; CCG: Carcinoma de célula grande.

Actualmente la clasificación de la OMS considera catorce subtipos de tumores epiteliales pulmonares según características basadas en parámetros histológicos e inmunohistoquímicos (16) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Clasificación OMS (2015) de los tumores epiteliales de pulmón (15)

Tipo histológico	Subtipo
<i>Adenocarcinoma</i>	Lepídico
	Acinar
	Papilar
	Micropapilar
	Sólido
	Mucinoso invasivo
	- Adenocarcinoma invasivo mixto mucinoso y no mucinoso
	Coloide
	Fetal
	Entérico
	Mínimamente invasivo
- No mucinoso	
- Mucinoso	
<i>Carcinoma de células escamosas</i>	Lesiones preinvasivas
	- Hiperplasia adenomatosa atípica
	- Adenocarcinoma in-situ (mucinoso y no mucinoso)
<i>Carcinoma de células escamosas</i>	Queratinizante
	No queratinizante
	Basaloide
<i>Tumores tipo glándula salival</i>	Lesiones preinvasivas
	- Carcinoma de células escamosas in-situ
	Carcinoma muco-epidermoide
	Carcinoma adenoide-quístico
	Carcinoma epitelial-mioepitelial
<i>Tumores neuroendocrinos</i>	Adenoma pleomórfico
	Carcinoma de célula pequeña
	- Carcinoma de célula pequeña combinado
	Carcinoma neuroendocrino de célula grande
	- Carcinoma de célula grande combinado
<i>Tumores neuroendocrinos</i>	Tumores carcinoides
	- Típico
	- Atípico
	Lesiones preinvasivas
	- Hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas
<i>Carcinoma de célula grande</i>	
<i>Carcinoma adenoescamoso</i>	
<i>Carcinoma pleomórfico</i>	
<i>Carcinoma fusocelular</i>	
<i>Carcinoma de células gigantes</i>	
<i>Carcinosarcoma</i>	
<i>Blastoma pulmonar</i>	
<i>Otros y carcinomas no clasificados</i>	

(Continúa en la siguiente página)

Tabla 4. (Continuación)

Tipo histológico	Subtipo
<i>Papilomas</i>	Papiloma de células escamosas
	- Exofítico
	- Invertido
	Papiloma glandular
	Papiloma mixto (escamoso y glandular)
<i>Adenomas</i>	Neumocitoma esclerosante
	Adenoma alveolar
	Adenoma papilar
	Cistadenoma mucinoso
	Adenoma de glándulas mucosas

Los tipos más frecuentes de CPCNP corresponden a ACA (30% a 50% de casos), seguidos por CCE (30%) (15); el carcinoma de célula grande (CCG) constituye el tercer subtipo en frecuencia (3-9% de todos los CPCNP) (20, 21).

La 4ª clasificación de la OMS de los tumores pulmonares adopta la estrategia propuesta para biopsias por la IASLC/ATS/ERS (16, 21) y la amplía a piezas quirúrgicas. Define así a los ACA como tumores epiteliales con diferenciación glandular, producción de mucina o expresión de marcadores neumocitarios valorados mediante IHQ y considera como CCE a tumores que muestren bien sea queratinización y/o puentes intercelulares o bien expresión IHQ de marcadores de diferenciación escamosa.

Los anticuerpos sugeridos como indicativos de ACA son TTF-1 (tinción nuclear) y Napsina A (tinción citoplasmática de más difícil valoración); como marcadores de diferenciación escamosa se consideran CK5, CK5/6, p63 y p40 (los dos últimos con tinción nuclear, con alta sensibilidad y especificidad).

A diferencia de la clasificación anterior (2004) (22), actualmente se considera que la expresión focal de marcadores IHQ neumocitarios (en al menos 1% de células tumorales) o difusa de p40/p63/CK5/6 (más de 10% de células tumorales positivas), permite excluir el diagnóstico de CCG (21, 23).

Asimismo, deja de considerarse al carcinoma neuroendocrino de célula grande como un subtipo incluido en el grupo de CCG, y pasa a la categoría de tumores

neuroendocrinos, en conjunto con los carcinomas de célula pequeña (CCP) y los carcinoides.

La aplicación de técnicas IHQ incluyendo marcadores de ACA y CCE, a la vez que el estudio mutacional de EGFR, ALK y ROS1 han redefinido nuestra concepción de la clasificación del CPCNP, disminuyendo de manera significativa el porcentaje de tumores diagnosticados como “NOS” (24, 25). Dada la diferencia entre los diversos marcadores IHQ disponibles, así como entre clones de anticuerpos y técnicas de diagnóstico molecular, la elección de qué marcadores y pruebas usar tiene un efecto directo en el diagnóstico final.

1.2.2 Clasificación molecular: La mayor comprensión de la compleja biología molecular del CPCNP, particularmente en lo referente a mutaciones activadoras de oncogenes (EGFR, KRAS, BRAF, HER2) (19, 26), traslocaciones (ALK, ROS1, RET) y amplificaciones (MET), permite identificar grupos de tumores con perfiles moleculares especiales susceptibles de responder a terapias dirigidas a dianas específicas (27-29). Estos hallazgos condicionan actualmente el flujo de trabajo y el manejo de la muestra, y son de obligada incorporación en la rutina diagnóstica (**Figura 6, Tabla 5**).

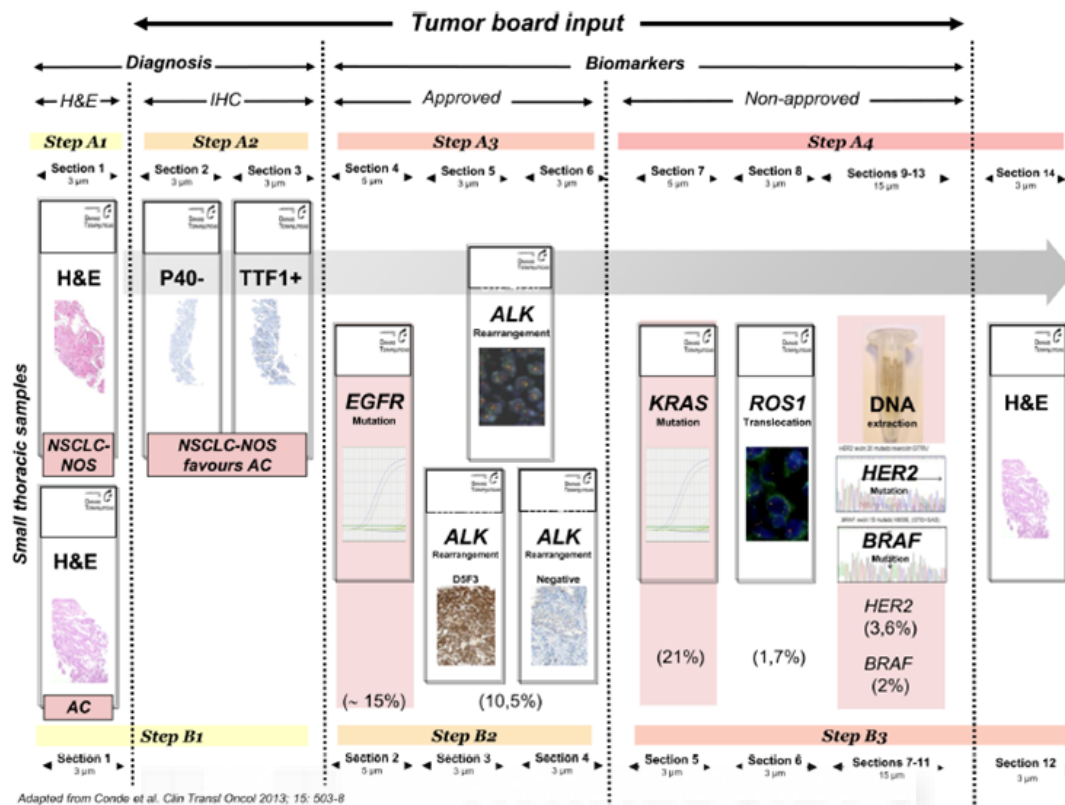


Figura 6. Flujo diagnóstico propuesto para manejo de la muestra en cáncer de pulmón. Tomado de: López-Ríos et al (38).

Tabla 5. Alteraciones moleculares y agentes terapéuticos específicos (28, 30)

Gen	Localización	% ACA	% CCE	Alteración	Agente terapéutico
EGFR	7p12	15-25	≤5	Del exon 19, L858R	Erlotinib Afatinib Gefitinib
KRAS	12p12.1	21	6	Mutación de aa 12 y 13	Ninguno
MEK1	15q22.1	1	NE	E56P, K57N, D67N	Selumetinib Trametinib
HER2	17q12	≤5	Rara	Inserción exón 20	Neratinib Afatinib Trastuzumab
ALK	2p23	4-6	Rara	Fusión EML4 or KIF5B	Crizotinib Sunitinib
ROS1	6q22	1-2	NA	Fusión con múltiples genes	Crizotinib
BRAF	7q34	2	1-3	G465V y L596R	Dabrafenib Vemurafenib Dasatinib

(continúa en la siguiente página)

Tabla 5 (continuación).

RET	10q11.2	1-2	NA	Fusión con KIF5B, CCDC6, o NCOA4	Vandetanib Sunitinib Sorafenib Cabozantinib
MET	7q31	≤5	≤5	Mutación exón 14	Tivantinib
MET	7q31	3-21	3-21	Amplificación	Terapia combinada: onartuzumab + erlotinib Tivantinib
PDGFRA	4q12	3-7	8-12	Amplificación	Sorafenib Sunitinib Crenolanib Pazopanib Axetinib
FGFR1	8p12	1	16-20	Amplificación	Dovitinib, PD173074 (v), AZD4547
PIK3CA	3q26.3	1-6	3-7	E542K, E545K, H1047R	XL147, BKM120
PIK3CA	3q26.3	6	33	Amplificación	Ninguno
PTEN	10q23.3	8-20	8-20	Delección	Ninguno
PTEN	10q23.3	2	10	Mutación exón 9, 29	Ninguno

NE: No Especificado

Algunas de estas mutaciones conductoras están presentes de manera casi específica en ACA (29), como es el caso de EGFR, KRAS y ALK, con lo cual es indispensable integrar en la clasificación las características moleculares, considerando información sobre alteraciones genéticas y nivel de expresión de proteínas, a la par con las características histológicas de cada tumor (26, 27, 31) (**Figura 7**). La distribución también varía en función del sexo y consumo de tabaco.

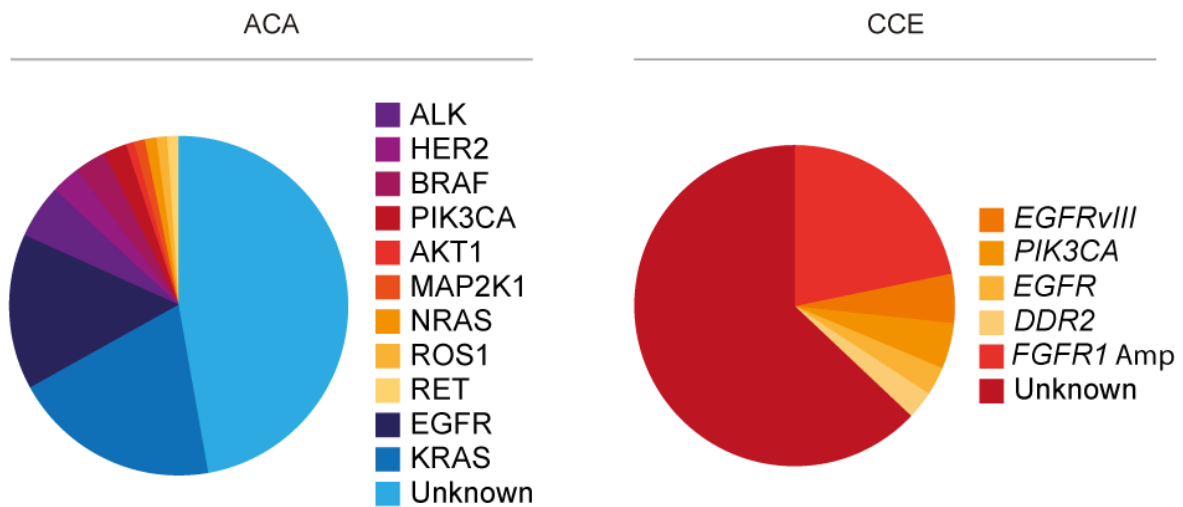


Figura 7. Mutaciones genéticas conductoras en ACA y CCE pulmonares. Tomado de Shames D, Wistuba I (28)

El tabaquismo se asocia con características clínicas y genéticas específicas (29); en los no fumadores (en quienes se desarrollan 25% de los cánceres pulmonares en el mundo), hay predominio de asiáticos, mujeres e histología de ACA. Genéticamente tienen mayor prevalencia de alteraciones de EGFR, PTEN, ALK, ROS1 y RET (13), mientras que en los fumadores son más frecuentes mutaciones de KRAS, TP53, BRAF, STK11 y JAK2/3, así como hipermetilación de p16 y LGALS4.

Las diferencias observadas entre fumadores y no fumadores van más allá de las alteraciones genéticas, e incluyen patrones diferentes de aberraciones cromosómicas. De manera colectiva estos hallazgos sugieren que los mecanismos oncogénicos son diferentes entre fumadores y no fumadores, incluso en tumores con igual tipo histológico (32, 33).

1.2.3 Implicaciones terapéuticas: La subclasificación molecular es de especial importancia debido a que los cambios genéticos son los principales condicionantes de la efectividad de la terapia molecular dirigida. Los hallazgos moleculares descritos han condicionado un enorme cambio, tanto terapéutico como en aspectos diagnósticos, que modifican el entendimiento que tenemos actualmente del CPCNP. Respecto al tratamiento, el panorama se ha extendido más allá de los citotóxicos indiscriminados, con dobletes de quimioterapia, hacia las terapias dirigidas. Tras la publicación en 2004 por Lynch y colaboradores de que tumores pulmonares en estadios avanzados podían ser susceptibles de respuesta a agentes contra pequeñas moléculas específicas (34), los avances han sido enormes.

El descubrimiento en los años 50 del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) señaló la importancia que tienen determinadas mutaciones en la génesis tumoral, y más trascendental aún, permitió desarrollar moléculas inhibitoras específicas (inhibidores de tirosin kinasa, ITK) (35) con mejoras significativas en las tasas de respuesta terapéutica y pusieron de manifiesto la necesidad de actuar contra dianas terapéuticas biológicamente relevantes. Como resultado de su éxito, cada vez un mayor número de agentes específicos está en desarrollo.

Es de esperar que el mejor entendimiento de las alteraciones genéticas y epigenéticas de los carcinomas de pulmón permitan desarrollar tratamientos más específicos, que a la vez eviten a los pacientes los efectos secundarios asociados a terapias sistémicas.

Mutaciones de EGFR: La presencia de mutaciones activantes en EGFR permite el tratamiento de los adenocarcinomas de este grupo con agentes inhibidores de EGFR, logrando una mayor tasa de supervivencia y calidad de vida (en comparación con el tratamiento convencional con quimioterapia). En años recientes se ha observado que hasta 25% de adenocarcinomas presentan mutación en el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por sus iniciales en inglés), componente clave en vías de señalización intracelular tumoral (34, 35).

Tras su unión con el ligando, EGFR activa una cascada en la que participan otras moléculas que incluyen PI3K/AKT y RAS/RAF/MAPK (36), que regulan la proliferación y apoptosis tumoral.

La identificación de estas vías moleculares permitió el desarrollo de dianas terapéuticas, que han demostrado efectividad en la prolongación de la supervivencia en pacientes tratados portadores de mutaciones de EGFR y ALK (37).

Esta disponibilidad de agentes terapéuticos hace que sea crucial refinar el diagnóstico del cáncer pulmonar para que, además de seleccionar los casos en que es posible predecir una adecuada respuesta a los inhibidores de EGFR tirosin quinasa y ALK, también podamos excluir los carcinomas escamosos, que exhiben menos tasas de respuesta a pemetrexed y tienen mayor riesgo de toxicidad con antiangiogénicos como bevacizumab (38).

Reordenamiento ALK: Otra categoría es la de los agentes dirigidos contra el gen ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), cuyo reordenamiento está presente en 4% a 7% de pacientes, principalmente no fumadores (38, 40). En 2011 la FDA aprobó el uso de crizotinib para CPCNP localmente avanzado o metastásico ALK (+), el cual ha demostrado incrementar la supervivencia en comparación con quimioterapia citotóxica sistémica. Si bien tras el tratamiento inicial con terapias dirigidas hay progresión de la enfermedad, su curso es de carácter lento y los pacientes aún exhiben algún beneficio clínico (en contraposición con la progresión tras tratamientos citotóxicos (38).

EGFR Y ALK se encuentran alterados sólo en una minoría de casos de CPCNP (principalmente no fumadores con adenocarcinomas) (26), pero su estudio es de obligada realización en todos los adenocarcinomas y carcinomas de célula grande, así como en carcinomas de células escamosas en pacientes no fumadores (38).

ROS1: Encargado de codificar una tirosina quinasa de la familia de receptores de insulina. Entre 1% a 3% de adenocarcinomas (principalmente entre jóvenes no fumadores) presentan fusiones de ROS1 con diversos genes (CD74, SLC34A2, EZR, LRIG3, SDC4, TPM3, FIG, CCDC6 y KDELR2) (41). En estas fusiones, la región 3 de ROS1 encargada de codificar el dominio de la quinasa está fusionada a la región 5 del respectivo gen compañero, y consecuencia de esto, se produce una proteína quimérica con actividad de quinasa que puede generar cascadas de señales oncogénicas. Los pacientes portadores de la mutación de ROS1 han demostrado respuesta a inhibidores de ALK, como crizotinib (38).

BRAF y *MET*: Son dianas potenciales. La mutación de *BRAF* (V600E) se asocia a mayor tasa de respuesta global al tratamiento con dabrafenib, en pacientes con adenocarcinoma que no han respondido a quimioterapia de primera línea (27, 80). En cuanto a *MET*, se ha establecido su papel como factor de peor supervivencia tras resección quirúrgica con intención curativa (42); está presente en 4% a 7% de casos de CPCNP y su sobreexpresión se relaciona con un mayor beneficio a tratamientos combinados (onartuzumab y erlotinib versus erlotinib mas placebo). Pacientes sin amplificación de *MET*, responden peor con esta combinación. Es posible que futuras investigaciones en este campo permitan el uso de biomarcadores para suministrar información no sólo pronóstica, sino también con valor predictivo de respuesta.

Inmunomoduladores: De manera más reciente, los inhibidores de puntos de control inmunitarios han emergido como una alternativa terapéutica en pacientes con CPCNP (43). La tasa de respuesta global es de alrededor del 20%, y se relaciona con la expresión de determinados receptores y ligandos, como el receptor de muerte programada (PD-1) y su ligando (PD-L1) (44).

La determinación de estos biomarcadores como herramientas predictoras de respuesta a inhibidores inmunitarios (inhibidores de puntos de chequeo inmune, *immune checkpoint inhibitors*) empieza a implementarse en la práctica clínica actual, ya que tumores con elevada expresión de PD-L1 responden significativamente mejor a inhibidores de PD-L1 y PD-1 (44). Su estudio mediante IHQ cobra relevancia para orientar el tratamiento con fármacos inhibidores (pembrolizumab, atezolizumab, entre otros) (44, 45, 79).

1.3 Patogénesis y heterogeneidad tumoral

Similar a tumores de otros órganos, en el CPCNP la clasificación TNM y el estado funcional global de cada paciente determinan las opciones terapéuticas y son predictores de supervivencia (46). Además del estadio, otros factores pronósticos independientes son el estatus de fumador, sexo, invasión vascular, infiltración pleural y determinados subtipos histológicos (16, 47).

Numerosos trabajos han buscado establecer otros marcadores que añadan información a los actuales estándares. Características nucleares combinadas con el grado arquitectural (subtipo histológico) al parecer contribuyen a estratificar mejor

pacientes con ACA estadio I (48, 49). Mayor número de mitosis y la cuantificación de la proliferación celular con Ki67, o la positividad para p53 son factores adicionales que señalan mal pronóstico, según algunas publicaciones (50-54), sin que se hayan establecido puntos de corte que mejor discriminen los pacientes. En el caso de CCE la utilidad de marcadores proliferativos está más cuestionada (51). Tal dificultad en la identificación de marcadores pronósticos es explicable si se considera la complejidad genómica del cáncer de pulmón, tal como se ha demostrado mediante secuenciación masiva. Se reconoce que la heterogeneidad intratumoral es un importante condicionante no sólo en términos de desarrollo de biomarcadores sino también de eficacia de agentes terapéuticos (32, 37, 55, 56) (**Figura 8**).

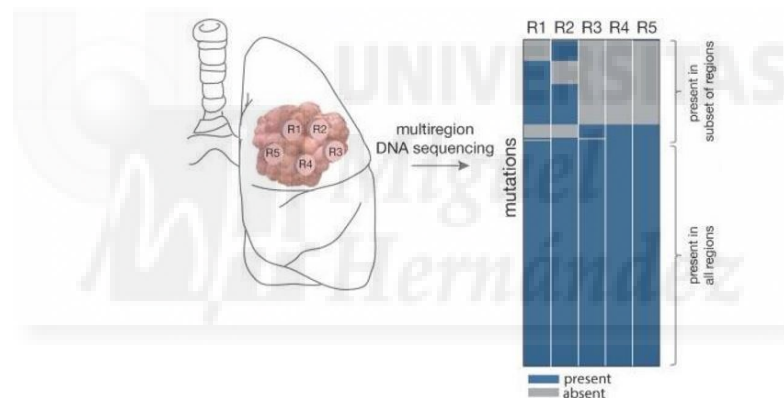


Figura 8. Heterogeneidad intratumoral. El análisis de múltiples regiones de ADN muestra cómo algunas mutaciones están presentes de manera amplia en todo un tumor, mientras que otras sólo se observan en algunas áreas (55, 56).

Multiregion DNA sequencing: Secuenciación de múltiples regiones de ADN

Este punto de vista permite ver los tumores como ecosistemas complejos, compuestos no sólo por células neoplásicas, sino también donde diferentes estirpes celulares (endoteliales, hematopoyéticas, estromales y otras), interactúan comportándose como una unidad (55). De esta manera, la “viabilidad tumoral” se incrementa, impactando así en la supervivencia.

El concepto de heterogeneidad tumoral no es novedoso y fue ya notado por patólogos del siglo XIX (56). Posteriormente, además de notables diferencias en cuanto a la morfología celular y a la histología de los tumores, se encontraron otras concernientes a variabilidad en marcadores de superficie, anormalidades genéticas, velocidad de crecimiento y respuesta al tratamiento. Estas observaciones permitieron concluir, hace ya más de 50 años, que dentro de una misma neoplasia coexisten diversas subpoblaciones de células.

Estudios experimentales en melanoma mostraron, al final de la década de los años 70, que el trasplante de células melánicas neoplásicas clonadas, en huéspedes genéticamente iguales (“singénicos”), generaba diferentes tipos de respuesta metastásica, señalando una heterogeneidad en las células tumorales progenitoras, y que solo algunos de los clones tuvieran capacidad de metástasis. Estudios posteriores en diversas neoplasias (sarcomas, mama, colon) reforzaron estas observaciones (55).

Una evidencia adicional que reforzaba el concepto de heterogeneidad tumoral fue obtenida en 1980, tras estudios del cariotipo de células tumorales gliales, que mostraron la coexistencia de diversas poblaciones clonales, heterogéneas, dentro de un mismo tumor, y que poseen diferentes sensibilidades a la quimioterapia y marcadas diferencias genéticas (57).

Al mismo tiempo, fue evidente también que las diferencias entre los clones tumorales afectaban su capacidad de proliferación y otros parámetros funcionales celulares, señalando nuevamente, que las células individuales dentro de un tumor, no eran homogéneas (58).

De particular importancia en esta etapa preliminar fue el hallazgo de que no toda célula tenía la capacidad de funcionar como una “célula iniciadora tumoral” (o T-IC, *Tumor-Initiating Cell*). Mediante estudios de clonalidad pudo establecerse que las neoplasias distan de ser una colección de células con capacidad similar de proliferación y que más bien semejan ecosistemas con redes complejas de interacción celular y diferentes características y propiedades individuales, que actúan en conjunto para mantener el crecimiento y progresión del tumor (59). Esta manera de funcionamiento, impacta en última medida, en la respuesta a agentes terapéuticos antitumorales.

En contraposición al modelo estocástico, que plantea que el crecimiento del tumor es un proceso aleatorio en el que pueden contribuir todas las células, el modelo de las *Cancer Stem Cells* sugiere que sólo algunas células neoplásicas cuentan con capacidad intrínseca para generar nuevos tumores (60). (**Figura 9**).

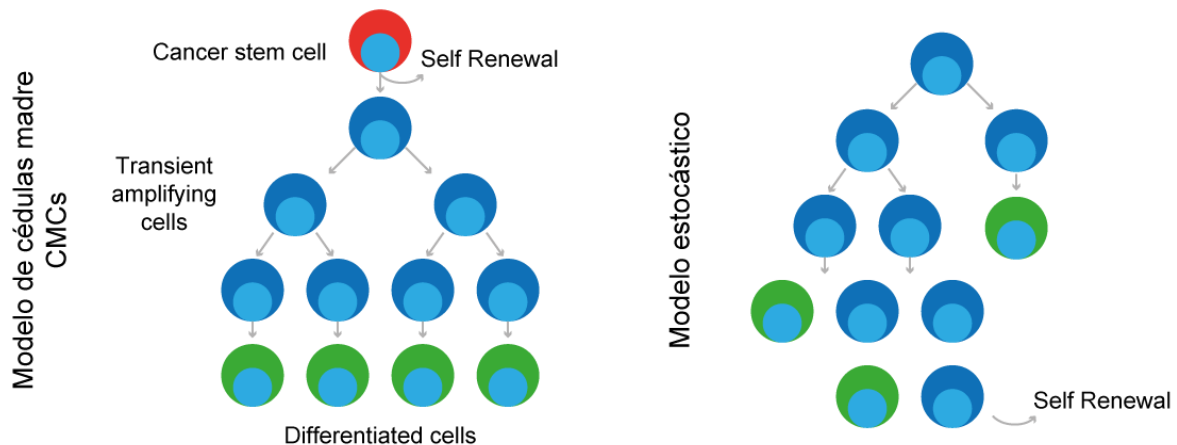


Figura 9. Modelo de Células Madre Cancerosas y modelo estocástico. El primero (CMCs) sugiere la existencia de una pequeña población celular (TICs) con capacidad de proliferación y auto-renovación. El modelo estocástico plantea que el crecimiento del tumor es un proceso aleatorio al que todas las células pueden contribuir.

Cancer Stem Cell: Célula madre cancerosa. *Self renewal:* Autorenovación. *Transient amplifying cells:* Células transitorias amplificadas. (Tomado de <http://www.eurostemcell.org/de/node/20794>)

Los mecanismos subyacentes a la heterogeneidad tumoral no están claros, si bien se postulan tres vías convergentes que colectivamente podrían explicar parte del fenómeno: diversidad genética, determinantes no genéticos y el microambiente tumoral (**Figura 10**).

Los **cambios genéticos** modifican el fenotipo (de manera acorde con los principios darwinianos). Las células con mutaciones favorables, las transferirán a su progenie y tendrán así una clara ventaja evolutiva. Sin embargo, este modelo genético no considera las variaciones funcionales observadas en subclones genéticamente homogéneos y es insuficiente para explicar por sí solo la diversidad tumoral.

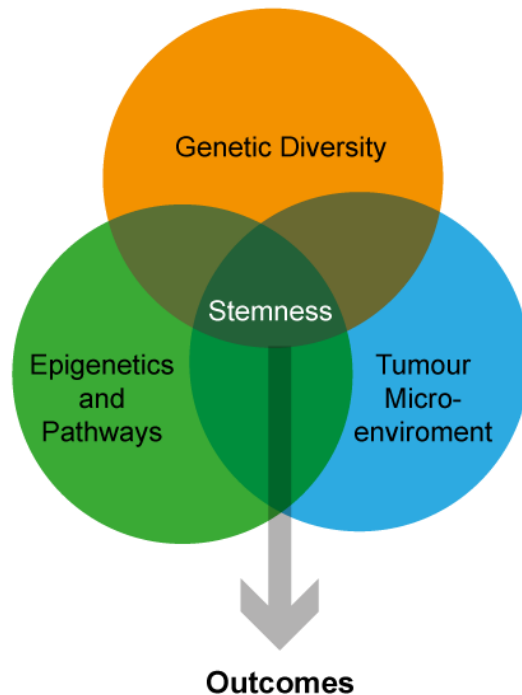


Figura 10. Genética, epigenética y microambiente convergen e influyen en la pluripotencialidad de las células neoplásicas, explicando no sólo la heterogeneidad tumoral sino también el comportamiento clínico.

Genetic Diversity: Diversidad genética. *Epigenetics and Pathways:* Epigenética y vías. *Stemness:* Pluripotencialidad. *Tumour Microenvironment:* Microambiente tumoral. Tomado de Kreso A, Dick J (61).

De manera paralela, los **determinantes epigenéticos** (metilación de ADN, modificación de histonas) crean microambientes tumorales organizados de manera jerárquica, en los cuales una subpoblación de células madre auto-renovables es responsable de la clonalidad sostenida del tumor. Por último, existen elementos celulares no tumorales (**microambiente tumoral**) que influyen en las células neoplásicas, modificando su función.

La complejidad del microambiente tumoral se acentúa con la capacidad de interacción (“comunicación”) entre células neoplásicas y estroma, desempeñando así un papel clave en la adaptación y en los mecanismos de resistencia a agentes anti-tumorales, explicando así cómo células con igual carga genética pueden ser sensibles o resistentes a un medicamento dependiendo del contexto en el que estén. Colectivamente estos tres elementos constituyen las claves para la viabilidad tumoral.

1.4 Teoría de las células madre cancerosas

Como se mencionaba en el apartado anterior, el modelo de carcinogénesis en relación con CMCs hace referencia a la capacidad de una pequeña población celular para iniciar y mantener el crecimiento tumoral. La era moderna de investigación en CMCs comenzó en 1961 (61) con estudios de clonalidad *in-vivo* que demostraron la capacidad de células hematopoyéticas para diferenciarse en múltiples líneas, manteniendo la capacidad intrínseca de auto-renovación (característica *sine qua non* de una célula madre).

La primera identificación de CMCs en tumores sólidos se logró hace cerca de 12 años en tumores de mama, tras el aislamiento en ratones de células CD44+ y CD24- que podían por sí solas mantener la viabilidad tumoral. Con estos hallazgos se puso en evidencia cómo las observaciones hechas en el modelo de leucemia mieloide aguda podían ser extrapolados a tumores sólidos. Estos resultados dieron origen a múltiples publicaciones que demostraban cómo las CMCs estaban presentes en neoplasias de diversos órganos, como SNC, cabeza y cuello, páncreas, próstata, colon y sarcomas (62, 63).

En particular, los tumores sólidos incluyen una mezcla compleja (heterogénea tanto en fenotipo como funcionalmente) de celularidad, que incluye células tumorales, CMCs y poblaciones diversas de células estromales, así como también moléculas bioactivas (citocinas y quimiocinas), que constituyen el microambiente tumoral (64, 81).

En el concepto de CMCs subyace su capacidad de pluripotencialidad (también entendida como “*stemness*”) que hace referencia a la manera en que se integran los diversos programas moleculares responsables de mantener el estado de célula madre. Tanto células madre normales como CMCs comparten características comunes que incluyen activación de las mismas vías moleculares encargadas de regular la pluripotencialidad y la habilidad de auto-renovación (81), que en el caso de las CMCs darán origen a grupos con diversos fenotipos y extensa capacidad de proliferación, condicionando no sólo una expansión continua tumoral, sino también resistencia a quimioterapia (66).

Este último punto constituye un tema de gran interés, ya que la resistencia de las CMCs a agentes quimioterapéuticos podría ser un factor principal en la aparición de recaídas tumorales y metástasis. Entre los mecanismos propuestos para explicar la

aparente resistencia de las CMCs a terapias anti-tumorales se cuenta su relativo lento ritmo de crecimiento (similar al de otras células madre no neoplásicas), lo cual condiciona menor respuesta a agentes dirigidos contra células de crecimiento rápido (67).

En resumen, las CMCs constituyen una población celular única, con capacidad de:

- Auto-renovación
- Diferenciación en diversas líneas
- Evasión de la terapia convencional citotóxica

Estas características las convierten en punto clave para el mantenimiento del crecimiento tumoral y la resistencia al tratamiento y por lo tanto, el camino en la búsqueda de terapias anti-neoplásicas exitosas obliga a entender la biología de las CMCs, convirtiéndose en punto esencial en las nuevas vías en estudio en tumores sólidos (68).

De manera particular en el CPCNP, la teoría de las CMCs se propone como una de las explicaciones a la marcada heterogeneidad tumoral observada (69), y constituye una vía pionera que contribuye a explicar la causa de resistencia al tratamiento convencional en tumores de pulmón aparentemente similares.

Como ya se ha mencionado, se han identificado poblaciones celulares con perfil de CMCs en un amplio rango de neoplasias, encontrando diversos marcadores de superficie asociados al fenotipo de *stem cells*. Sin embargo, los resultados de expresión de estos marcadores son con frecuencia contradictorios, lo que limita su aplicación clínica (69).

1.5 CMCs y pulmón

A diferencia de otros tumores sólidos, en los que la elevada población de células madre se correlaciona con un fenotipo más agresivo, en el pulmón los resultados no son claros (70), si bien se señala que existe una distribución diferencial de los marcadores de CMCs entre los diversos tipos histológicos (65). También diversos estudios preclínicos relacionan la presencia de CMCs y quimioresistencia (71).

La existencia de CMCs pulmonares contribuiría a explicar el porqué los tratamientos actuales si bien reducen masa tumoral, no son efectivos en la eliminación de CMCs, las cuales con el tiempo, conducen a recaídas. Como resultado, si bien mediante quimioterapia es posible disminuir la masa tumoral, su efecto es usualmente transitorio, sin que impacte de manera significativa en la supervivencia de los pacientes (72).

Se propone que la identificación y cuantificación de CMCs en una neoplasia, podría contribuir a determinar la agresividad del tumor; es por esto que las CMCs son considerados marcadores potenciales con valor pronóstico en pacientes oncológicos (82).

Marcadores de células madre en pulmón:

La ausencia de marcadores validados para la identificación de CMCs es una importante limitante de las observaciones anteriormente anotadas, si bien de manera creciente se conocen proteínas asociadas (CD44, CD24, ALDH1, CD133 y Sox2, entre otras) útiles para identificar poblaciones de CMCs, y que además son posibles de valorar mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) asequibles en la práctica clínica. La importancia de la expresión de CMCs en CPCNP en estadios tempranos aún se desconoce.

1.5.1 *CD44*: Es una glicoproteína de superficie multifuncional y multiestructural ampliamente expresada, producto de un único gen localizado en el cromosoma 11 que contiene 20 exones (73), 10 de los cuales (exones 6-15) pueden separarse de manera alternativa (*alternatively spliced*) (v1-v10).

Los exones 1-5 (s1-s5) y 16-20 (s16-s20) se expresan de manera constante en la mayoría de tejidos, generando la forma estándar de la proteína CD44 (CD44s).

CD44 tiene 4 dominios funcionales. En el interior de la célula (**dominio intracelular**), CD44 interactúa con el citoesqueleto mediante la unión directa a anquirina (**Figura 11**).

La posterior interacción de anquirina con CD44s es un paso necesario para la modulación de la expresión de CD44s en la superficie celular y el desempeño de sus funciones de adhesión (74). El **dominio extracelular** es el sitio donde se produce la ruptura alternativa (*alternative splicing*) del mRNA producto del cual se generan sus isoformas. CD44 incluye una amplia variedad de isoformas, producto de la rotura (*splicing up*) de hasta 20 exones, los cuales generan diversos sitios de unión para la molécula.

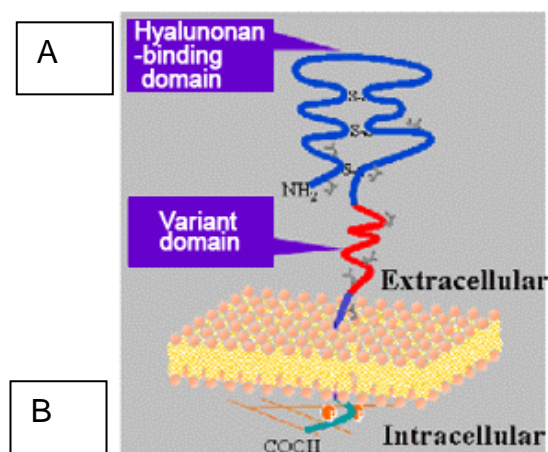


Figura 11. Dominio extracelular de CD44 (**A**), mediante el cual se une a componentes de la matriz extracelular (como el hialuronato) y dominio intracelular (**B**), unido a microfilamentos que participan en funciones de movilidad y migración celular.

La isoforma estándar de CD44 (CD44s) es una proteína de bajo peso molecular conformada por los exones 1-5 y 16-19 que se mantienen unidos (74). CD44s se une fuertemente al hialuronato (a diferencia de formas de mayor peso molecular), y dependiendo del tipo de célula en que se exprese, cumple diversas funciones que modulan las interacciones entre la célula y la matriz extracelular (**Tabla 6**).

Tabla 6. Funciones de CD44s (75, 76)

<i>Procesos biológicos</i>
Reclutamiento de linfocitos
Hematopoyesis
Inflamación
Cicatrización de heridas
Apoptosis / Supervivencia celular
Señalización intracelular (a través de asociación con actina del citoesqueleto)
<i>Procesos neoplásicos</i>
Proliferación
Invasión
Migración
Diferenciación
Adhesión celular
Metástasis

CD44s se expresa en amplio número de tejidos sanos, a la vez que en tumores de origen epitelial (65). Su cuantificación, mediante IHQ, muestra una tinción de membrana y en tumores pulmonares, se observa predominantemente en CCE, si bien es en adenocarcinomas donde su expresión ha demostrado significado pronóstico, condicionando una peor supervivencia.

1.5.2 CD44v: La división de los exones 6-15 genera diferentes isoformas, entre las que destaca la variante del exón 6 (CD44v6), debido a que estudios preliminares en modelos murinos en la década de los 90's, mostraron que cumplía un papel en la regulación de procesos de invasión, progresión y metástasis tumoral (77). Posteriormente, en estudios en humanos, se identificó expresión de CD44v6 en el parénquima pulmonar fetal y adulto, y en 2011, se demostró su asociación con células madre epiteliales.

Se postula que CD44v6, al actuar como ligando de osteopontina, cuenta con capacidad de promover la adhesión de células tumorales al endotelio vascular y a membranas basales. También incrementa la capacidad de migración de células neoplásicas (77). CD44v6 está sobreexpresada en leucemia y neoplasias de cabeza y cuello, mama, estómago, colon, endometrio y ovario (78, 65). El incremento de su expresión condiciona mayor capacidad de metástasis (73).

Significado de la expresión de CD44 y CD44v: CD44 ha demostrado, tanto de manera aislada como en combinación con otros marcadores, utilidad para la identificación de CMCs (74). Está sobreexpresada en tumores de vía biliar, cáncer de mama, vejiga, cabeza y cuello, colon y carcinoma hepatocelular (**Tabla 7**). En neoplasias gástricas se ha demostrado que es un marcador pronóstico negativo y recientemente se estableció su valor como factor pronóstico independiente negativo cuando se expresa en células tumorales localizadas en el margen infiltrante (73). Sin embargo, su expresión está disminuida en otras localizaciones como epitelio esofágico con displasia por Barrett, cáncer de endometrio metastásico y próstata. Trabajos desarrollados preferentemente en mama, sugieren que su expresión en el contexto de negatividad para CD24, confiere a las células tumorales características de células madre.

Tabla 7. Expresión de CD44: variantes y significado (83,84). Resultados contradictorios y variables entre estudios.

Variante	Órgano	Expresión	Significado
CD44	Cabeza / cuello Vía biliar Vejiga Colon	Sobreexpresada	Peor pronóstico
	Carcinoma hepatocelular		
CD44v6	Mama Leucemia Estómago Tumores de cabeza y cuello	Sobreexpresión asociada a CD24 negativa	Confiere perfil de CMCs a células neoplásicas
	- Cáncer de esófago en el contexto de esófago de Barrett - Carcinoma de endometrio metastásico - Carcinoma urotelial de alto grado - Próstata - Tumores de SNC de alto grado		
CD44		Disminuida	Mayor capacidad de infiltración
CD44s y CD44v6	CPCNP (incluyendo ACA y CCE)	Sobreexpresión	Peor pronóstico
CD44s CD44v	Glioblastoma	Sobreexpresión	Peor pronóstico

En el pulmón los resultados no son claros, y el análisis está condicionado por la heterogeneidad de los estudios. La mayoría de trabajos incluyen pacientes en estadios avanzados, y emplean diferentes anticuerpos. En general, se sugiere que la sobreexpresión de CD44 se relaciona con tumores pobremente diferenciados y curso agresivo; asimismo, se ha observado que su activación condiciona resistencia a agentes quimioterapéuticos en líneas celulares de CPCNP; en ACA su expresión se ha relacionado de manera inversa con el grado nuclear (81). En el análisis univariado de este grupo (ACA), los tumores lepidicos, microinvasivos y mucinosos, así como casos de hiperplasia adenomatosa atípica, muestran menor expresión de CD44. Sin embargo, otros muestran peor pronóstico en tumores con pérdida de expresión (83).

Mediante IHQ, CD44v6 en carcinoma de pulmón muestra un patrón de membrana. Similar a lo observado para CD44s, la isoforma v6 también se expresa con mayor frecuencia en CCE (78). Se postula que la mayor expresión de CD44v6 observada

en los CCE guarda relación con el origen de estos tumores a partir de células basales bronquiales (que en condiciones normales son intensamente positivas para CD44v6) y que tras sufrir metaplasia, progresan a carcinoma infiltrante (78). En otras palabras, el patrón de tinción de CD44v6 observado en los carcinomas de células escamosas recapitula aquel de las células basales bronquiales no neoplásicas.

En el caso de ACA no es frecuente observar positividad de CD44. Debido a que los neumocitos tipo II expresan CD44v6, cabría esperar que el subgrupo de ACA con patrón predominantemente lepidico tuviesen mayor expresión. Sin embargo, los estudios no han confirmado este supuesto (78).

En conclusión, tanto para CD44 como para sus isoformas, los resultados son variables, por lo que actualmente se desconoce el significado de su expresión especialmente en lo relativo a pronóstico en CPCNP.

1.5.3 CD24: Es una pequeña proteína de superficie (20 a 70 kD) fuertemente glicosilada expresada en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo linfocitos T activados, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (85). Está implicada en procesos de inflamación, inmunidad y cáncer (86).

CD24 es producto de un gen localizado en el cromosoma 6 (6q21); tras el clivaje de su proteína precursora en un péptido más corto de 32 aminoácidos, es anclada a la membrana celular por medio de una unión de fosfatidilinositol glucosilado (GPI).

CD24 (también conocida como “proteína asociada a metástasis”) ejerce como ligando de P-selectina, un receptor de adhesión en endotelios activados y plaquetas. Interactúa con GTPasas pertenecientes a la superfamilia Ras. Estas GTPasas monoméricas fueron identificadas y aisladas por su similitud con K, N y R-Ras, aunque durante largo tiempo se supo bastante poco de ellas (85). Sin embargo, a partir del descubrimiento como efectores directos del oncogen Ras, han ido ganando creciente notoriedad, especialmente en el campo de la oncología.

Actualmente se sabe que son importantes mediadores de la transformación, tumorigénesis y progresión tumoral por lo que, en teoría, CD24 podría contribuir a las capacidades metastásicas de tumores que expresen esta molécula (85).

Significado de la expresión de CD24: Se ha postulado como marcador de células madre, expresado a menudo en combinación con otras moléculas de adhesión / migración que incluyen CD44, CD29 y CD31 (87).

CD24 se expresa de manera normal en células del sistema inmune y SNC (neurales, ganglionares, astrocitos y microglía) y en tejidos en formación o en regeneración; también está presente en queratinocitos y túbulos renales.

Tras su identificación como marcador de células madre se ha demostrado también que CD24 está relacionada con mayor agresividad tumoral, y que participa tanto en estados iniciales de tumorigénesis, como en etapas posteriores generando metástasis (64).

Su expresión se ha descrito en neoplasias hematológicas y tumores sólidos, como carcinoma de células renales, carcinoma pulmonar de célula pequeña, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de mama y ovárico (86).

En el parénquima pulmonar sano, CD24 se expresa en la membrana apical del epitelio bronquial; también se observa expresión con patrón circunferencial de membrana en las paredes de revestimiento alveolar (86). En pulmón tumoral, la expresión de CD24 es de patrón citoplásmico y de membrana y su positividad se relaciona con peor pronóstico (86). Existen diversos polimorfismos del gen que codifica esta proteína, sin que se haya demostrado asociación específica de alguno de ellos con variables de resultado específicas (pronóstico, supervivencia). Los resultados están limitados por la ausencia de validación en grandes series.

1.5.4 ALDH1: La familia de la Aldehído Deshidrogenasa (**ALDH**) comprende 19 isoformas, localizadas en el citoplasma, mitocondria o núcleo celular (88), y presentes normalmente en diversos tejidos sanos, entre los que destacan hígado y riñón.

Como producto de la degradación oxidativa de los lípidos de membrana, así como del catabolismo de aminoácidos, carbohidratos y neurotransmisores, se generan de manera fisiológica aldehidos, los cuales son necesarios para múltiples procesos fisiológicos (visión, neurotransmisión y desarrollo embrionario). Dichos aldehidos son citotóxicos y deben ser degradados, proceso en el que participan las ALDH convirtiendo los aldehidos intracelulares a ácido carboxílico.

Otras funciones de las ALDH incluyen la de actuar como proteínas de unión para diversas moléculas (como andrógenos y colesterol) y servir como potenciales anti-

oxidantes mediante la producción de NAD(P)H. ALDH actúa en la vía de señalización del ácido retinoico mediante la oxidación del retinal, función que de manera particular se ha relacionado con la pluripotencialidad (“stemness”), propia de las CMCs (**Figura 12**) (88).

Entre las diversas isoformas de ALDH, la de clase 1 (ALDH1) es la que predomina en mamíferos (89). ALDH1 es un biomarcador subrogado de células hematopoyéticas y en estudios in-vitro se ha observado que células neoplásicas que muestran alta actividad de ALDH1 poseen características de células madre, incluyendo capacidad de auto-regeneración, elevada proliferación y resistencia a quimioterapia.

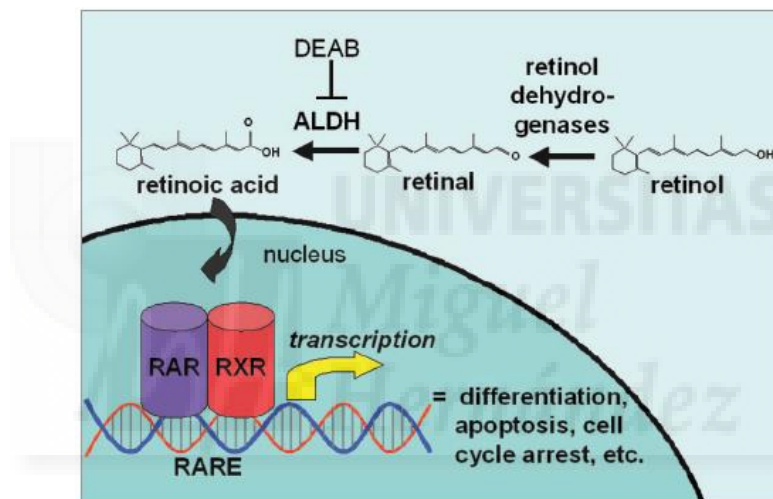


Figura 12. Vía de señalización del ácido retinoico y papel de ALDH. El retinol es oxidado por las retinol deshidrogenasas y convertido en retinal, el cual mediante las ALDH citosólicas, genera ácido retinoico, que difunde al núcleo e inicia la transcripción de genes. El ácido retinoico actúa mediante su unión con: (1) los receptores de ácido retinoico (RAR) y los (2) receptores X de retinoides (RXR). Según el contexto celular, el resultado final varía entre diferenciación, apoptosis o detención del ciclo celular (89). DEAB: dietilaminobenzaldehído

Significado de la expresión de ALDH1: Se ha identificado incremento en la actividad de ALDH1 en diferentes neoplasias, como vejiga (90), mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, tumores de SNC y mama (89, 91). La positividad para ALDH1 se correlaciona con resistencia a quimioterapia y peor pronóstico (**Tabla 8**) (89).

En cultivos celulares de tumores pulmonares (específicamente CPCNP) es posible identificar la expresión de dos isoformas de ALDH: ALDH1A1 y ALDH3A1, que se encuentran sobreexpresadas, tanto al ser comparadas con tejido pulmonar sano como con células tumorales en casos de carcinoma de célula no pequeña (92).

También se ha demostrado asociación entre la sobreexpresión de ALDH1 y comportamiento biológico más agresivo en casos de CPCNP (91, 92).

El aislamiento de células neoplásicas ALDH (+) muestra en éstas una mayor capacidad de proliferación, auto-renovación y resistencia a quimioterapia, en contraposición a células tumorales ALDH (-). Tal expresión está relacionada con mayor actividad de la vía Notch (importante en la homeostasis de células madre tanto normales como tumorales). Su supresión (vía mecanismos químicos y genéticos) conduce a una disminución en la capacidad clonogénica de las células tumorales ALDH(+) (92).

Tabla 8. Expresión de ALDH en diversas neoplasias. Valoración mediante técnicas de fluorescencia con aldefluor (89).

Isoforma	Tipo de tumor	Tamaño de muestra n	Correlación pronóstica		
			Peor / Mayor agresividad	Ninguna	Mejor / Menor agresividad
ALDH	Leucemia	65	X		
ALDH1A1	Vejiga	216	X		
ALDH1A1	Mama	577	X		
ALDH1A1	Mama	203		X	
ALDH1A1	Mama	381		X	
ALDH1A1	Mama	109	X		
ALDH1A1	Mama	639		X	
ALDH1A1	Mama	47		X	
ALDH1A1	Colon	1420		X	
ALDH1A1	Pulmón	60	X		
ALDH1A1	Ovario	442			X
ALDH1A1	Ovario	439	X		
ALDH1A1	Páncreas	269	X		
ALDH1A1	Próstata	40		X	
ALDH1A1	Próstata	163	X		
ALDH1A3	Mama	47	X		
ALDH2	Mama	47	X		
ALDH4A1	Mama	47		X	
ALDH7A1	Próstata	40		X	

Trabajos más recientes que han valorado la expresión citoplasmática de ALDH1 en tejido parafinado muestran resultados dispares; los hallazgos en dos cohortes (134 y 296 pacientes con CPCNP) evidenciaron una mayor supervivencia (global y libre de enfermedad) en relación con mayor expresión de ALDH1 (93). En contraposición, también hay resultados que muestran menor supervivencia libre de recaídas ($p=0,025$) y menor supervivencia global ($p=0,017$) en casos con mayor expresión citoplasmática de ALDH1 (205 pacientes en estadio I) (95).

El significado de la expresión nuclear de ALDH no es claro. Al respecto hay un reporte de 3 casos de pacientes con CPCNP con histologías dispares, mostrando mejor pronóstico relacionado con la positividad nuclear (94).

1.5.5 SOX2: también conocida como SRY-box 2 (**Sex determining Region Y-box 2**). Es un factor de transcripción de 317 amino ácidos, involucrado en la conservación de la pluripotencialidad de las células madre en embriones. Esta proteína es codificada por un gen perteneciente a la familia de factores de transcripción SOX HMG-box (**High Mobility Group**) relacionados con SRY, los cuales se encuentran implicados en la regulación del desarrollo embrionario del tracto respiratorio y del sistema nervioso central (96).

Diversas mutaciones en este gen han sido asociadas con hipoplasia del nervio óptico y microftalmia. SOX2 tiene un dominio HMG que es un regulador crítico del funcionamiento normal de células madre tanto embrionarias como neurales (97).

Significado de la expresión de Sox2: Participa en procesos de morfogénesis. Este oncogén está amplificado y sobreexpresado en diversos tumores, incluyendo pulmón, cabeza y cuello, esófago, mama, estómago y colon, así como en ciertos tipos de tumores pobremente diferenciados (96). Estudios retrospectivos han demostrado una elevada capacidad pronóstica de la vía Nanog/Oct4/Sox2 en pacientes con diversos tipos de neoplasias, incluyendo pulmón (98).

En carcinomas escamosos de pulmón y esófago, Sox2 se encuentra amplificado, y se ha demostrado incremento en el número de copias (*copy number gains*) en diversas regiones del genoma de carcinomas de pulmón de célula no pequeña. Sox2 actualmente tiene utilidad práctica para la identificación y subdivisión de tumores de células germinales; fuera de este contexto, su aplicación en la práctica clínica es limitada.

Aunque el significado biológico de la sobreexpresión de Sox2 es aún desconocido, se sabe que frecuentemente se encuentra regulado al alza (*up-regulated*) en neoplasia pulmonares, y que la amplificación de su gen se correlaciona con sobreexpresión de su proteína en CPCNP (96).

De manera predominante, se observa expresión y amplificación de Sox2 en CCE, y en menor proporción, en ACA (expresión difusa e intensa en $\cong 90\%$ de CCE versus $\cong 20\%$ de ACA) (98). Las lesiones in-situ de tipo escamoso (displasia y carcinoma in-situ) también presentan mayor expresión de Sox2, ausente en lesiones precursoras de tipo glandular (hiperplasia adenomatosa atípica).

En CCE la expresión y amplificación de Sox2 se relaciona con mejor pronóstico, si bien no constituye un factor pronóstico independiente (97). Por el contrario, en ACA la evidencia señala resultados opuestos. En 104 casos de ACA estadio I se observó cómo su expresión se asociaba de manera estadísticamente significativa ($p=0,0006$) con menor tiempo de progresión y supervivencia global, tanto en el análisis univariado como en el multivariado, observándose mayor expresión en relación con casos de invasión pleural (98). Los hallazgos de este estudio no han sido validados y están limitados tanto por el tamaño muestral como por el método de detección semi-cuantitativo de expresión de Sox2.

1.5.6 CD133: (o AC133) es una glicoproteína transmembrana, identificada en 1997 en células epiteliales murinas y, en el mismo año, en células hematopoyéticas humanas. Debido a que “sobresale” en la superficie celular, también se ha denominado Prominina-1 (término del latín “*Prominin*”, que significa prominente) (**Figura 13**). Posteriormente ha sido identificada en progenitores endoteliales, linfangiógenicos y miogénicos.

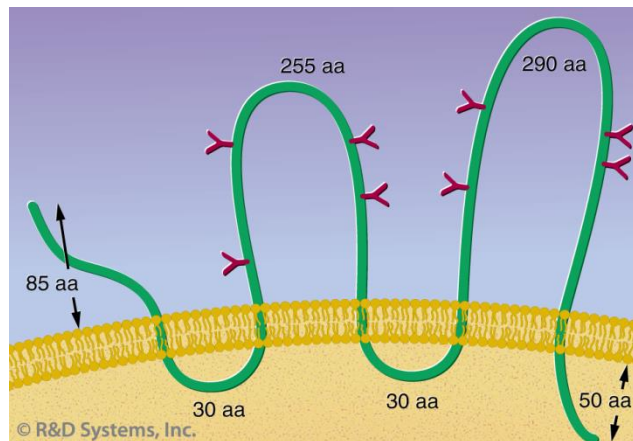


Figura 13. CD133 es una glicoproteína de 120kDa con 5 dominios transmembrana que dividen dos pequeñas asas intracelulares y dos asas mayores, extracelulares.

Aunque se desconoce la función biológica de CD133, se sabe que además de estar presente en células epiteliales maduras también es un marcador de células madre (tanto de tejidos normales como tumorales) lo cual ha validado su uso, tanto sola como en combinación con otras proteínas, para identificar células madre de diversos tejidos como médula ósea, cerebro, riñón, próstata, hígado, páncreas y piel (99).

Los primeros anticuerpos anti CD133 disponibles, AC133 y AC141 se unen a epítopes glicosilados de CD133; con posterioridad se desarrollaron otros con unión a epítopes peptídicos en el asa extracelular de la proteína. No es claro si el estatus de glicosilación modifica la actividad de CD133, condicionante que se debe tener en cuenta en la interpretación de los estudios disponibles (100).

Significado de la expresión de CD133: Con relación a su expresión en células tumorales, mediante anticuerpos monoclonales, CD133 se ha identificado en neoplasias de cerebro, próstata, hígado, pulmón y colon (101).

Estudios de IHQ en tejido tumoral de pacientes con carcinomas primarios de colon en diversos estadios y localizaciones (ciego, sigma y rectosigma) han mostrado una expresión omnipresente de CD133 en células tumorales. Se conoce que su expresión está regulada a la baja (*down regulated*) en subgrupos celulares tras la aparición de metástasis (tumores más agresivos con capacidad de metástasis son CD133-), lo cual sugiere que es posible que CD133 no tenga un papel funcional *per se* en el crecimiento tumoral (95).

En el pulmón se han identificado células *stem-like* CD133+ con capacidad de auto-

renovación y de generación de progenie ilimitada de células no neoplásicas (en contraposición con células CD133^{NEG}, incapaces de este potencial) (99), haciendo de CD133 uno de los marcadores más empleados para la identificación de células madre pulmonares.

Se plantea que tumores con alto nivel de expresión de CD133 son más agresivos y tienen peor curso clínico (101). En un grupo de 177 ACA estadio I se observó mayor tasa de recaída (17,3% *versus* 4,2%) ($p=0,004$) en casos con alta expresión de CD133, así como peor supervivencia libre de enfermedad a 5 años (77,2% *versus* 95,1%) ($p=0,004$) (101). Resultados similares se publican en 2014 (102), mostrando una relación entre expresión alta de CD133 y menor supervivencia global en carcinomas estadio I ($p=0,039$).

En consonancia con lo señalado anteriormente, en un meta-análisis de 2014 se sugiere que CD133 constituye un marcador de peor pronóstico, asociándose con menor grado de diferenciación tumoral y presencia de metástasis ganglionares (103).

1.6 Identificación y cuantificación de células madre

La metodología concerniente a la identificación de las células madre es un punto fundamental. Se considera que la habilidad de una célula para reproducirse *in-vivo* en tumores trasplantados en huéspedes inmunodeficientes constituye el *gold standard* que define su potencial tumorigénico, siendo necesario además, diferenciar y separar las CMCs de otros componentes estromales del tumor (63, 66). La identificación de CMCs en los estudios iniciales se basó principalmente en técnicas de xenotrasplantes en ratones inmunodeprimidos usando subpoblaciones tumorales humanas obtenidas de material de biopsia. Pese a que las observaciones eran útiles para validar las propiedades biológicas de subpoblaciones tumorales, al ser diferentes del tumor primario no eran suficientes para el aislamiento de CMCs; fueron sin embargo de gran utilidad para reproducir el fenotipo y la morfología de diversas neoplasias como leucemias, cáncer de mama, SNC, colon, cabeza y cuello, ovario y páncreas (82).

Actualmente los estudios usan dos tipos de metodologías: la primera busca identificar CMCs mediante la medición del **nivel de actividad**, el cual varía en función del tipo de neoplasia mientras que la segunda alternativa se basa en

conocer el **nivel de expresión de sus proteínas**. La mayoría de estudios se han desarrollado valorando la expresión de proteínas y buscando asociaciones con implicaciones clínicas.

1.6.1 Estudio del nivel de actividad:

- Expresión de enzimas citoprotectoras: como la aldehído deshidrogenasa (ALDH1), con técnicas de aldeflúor, de escasa aplicación en la práctica clínica.
- Presencia de proteínas transportadoras unidas a ATP o timosina b4 (Tb4), un péptido pequeño de unión a actina acídica.

Entre las limitaciones de estos estudios se incluyen las diferencias en el estatus de glicosilación que cambia en condiciones in-vivo e in-vitro, condicionando los resultados.

1.6.2 Métodos de detección de expresión de proteínas:

Los más usados son la citometría de flujo y técnicas de inmunofluorescencia e IHQ enzimática. Se han empleado también análisis de formación de esferas in-vitro (pruebas empleando colonias celulares que se usan para conocer la pluripotencialidad de una célula y además permiten estudiar en éstas el efecto de medicamentos), qRT-PCR y Western blot.

La citometría de flujo se basa en el uso de diferentes marcadores específicos, incluyendo proteínas de superficie, moléculas señalizadoras y valoración de la expresión diferencial de miRNAs en las CMCs.

La sensibilidad entre técnicas de citometría de flujo e IHQ varía considerablemente, lo cual dificulta la comparación de resultados (ejemplo, CD133 cuya valoración por IHQ es generalmente considerablemente mayor en términos de porcentaje de células positivas que la misma realizada mediante citometría de flujo) (101). Cada técnica cuenta además con limitaciones que condicionan los resultados (**Tabla 9**).

Tabla 9. Principales limitaciones de las dos técnicas más empleadas para la identificación de CMCs

Metodología	Limitaciones
Citometría de flujo	Necesidad de emplear técnicas enzimáticas y/o mecánicas para lograr suspensiones celulares de una única célula, que afectan el microambiente celular y la expresión de proteínas
IHQ	Ausencia de estandarización y estudios de validación Múltiples clones de Ac usados, con diversas afinidades Subjetividad en la interpretación de resultados

El paradigma actual de medicina personalizada y de precisión se fundamenta en la disponibilidad de nuevas herramientas diagnósticas que delimiten mejor los diversos grupos de riesgo. La adecuada identificación de CMCs mediante IHQ representa una oportunidad de enriquecer el diagnóstico anatomopatológico aportando información con fines pronósticos con procedimientos relativamente sencillos y accesibles. El estudio de marcadores relacionados con CMCs puede ser un prometedor procedimiento que contribuye a una más precisa estratificación de los pacientes.



2. JUSTIFICACIÓN

La heterogeneidad en el grupo CPCNP en estadios I y II condiciona una amplia variabilidad tanto en la tasa de recaída como en la supervivencia global a 60 meses (90% a 56%) (17), sin que actualmente se disponga de marcadores que permitan una subestadificación adecuada y señalen qué pacientes podrían beneficiarse de tratamiento adyuvante. Por ello es importante poder construir un perfil lo más completo posible de cada tumor, integrando la información histológica con alteraciones genéticas y de expresión de proteínas (28).

La presencia de células madre en tumores pulmonares es bien conocida (67) pero su impacto clínico no está claramente definido. El presente trabajo busca conocer la relación entre la expresión de proteínas de célula madre con el pronóstico en diferentes grupos histológicos. Su desarrollo en una cohorte extensa y plenamente caracterizada, así como el empleo de técnicas de IHQ (de uso habitual en los servicios de Anatomía Patológica) confieren, además de solidez a los hallazgos, la posibilidad de una fácil reproducibilidad.

Cabe esperar que los resultados permitan establecer grupos con uniformidad pronóstica (de supervivencia), así como identificar pacientes con mayor riesgo que puedan beneficiarse de estrategias terapéuticas enfocadas a disminuir la diseminación metastásica y la recaída tumoral.



3. HIPÓTESIS



El perfil de expresión de marcadores de células madre en carcinomas de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) en estadios iniciales (I y II) se relaciona con la probabilidad de recaída y la supervivencia global.

Es esperable que la aplicación de un panel de proteínas relacionadas con células madre permita subclasificar tumores de características (histológicas e inmunohistoquímicas) equiparables y definir grupos de pacientes con un pronóstico similar.





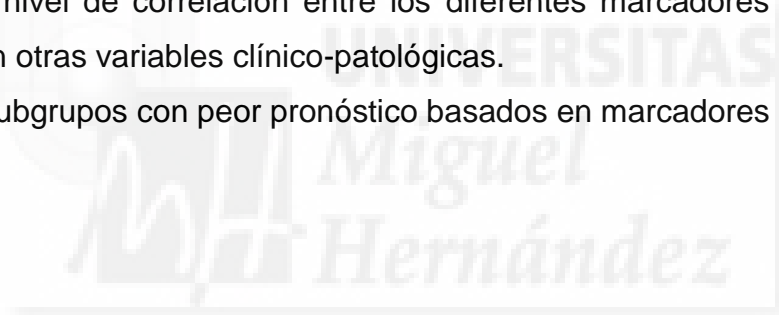
4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Evaluar el significado pronóstico de la expresión de marcadores relacionados con células madre cancerosas (CMCs) en pacientes intervenidos de carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP) en estadios iniciales.

4.2 Objetivos secundarios

1. Describir el patrón de expresión inmunohistoquímica de cada marcador de CMCs en las células neoplásicas.
2. Conocer la prevalencia de la expresión de los marcadores de CMCs mediante IHQ en CPCNP en estadios iniciales.
3. Establecer si existen diferencias en la expresión de marcadores de CMCs entre tipos histológicos (ACA, CCE y CCG).
4. Analizar el nivel de correlación entre los diferentes marcadores de CMCs y su asociación con otras variables clínico-patológicas.
5. Identificar subgrupos con peor pronóstico basados en marcadores de CMCs.



5. MATERIAL Y MÉTODOS



5.1 Tipo de estudio

Estudio observacional de tipo retrospectivo realizado en el Hospital General de Alicante (HGUA).

5.2 Selección de casos

5.2.1 Criterios de inclusión: Tumores primarios pulmonares en estadios iniciales (I y II) sin metástasis ganglionares (pN0), diagnosticados e intervenidos en el HGUA entre enero de 2002 hasta diciembre de 2011. Debido a que la más reciente actualización de criterios diagnósticos de la OMS es de 2015 (16), los casos se diagnosticaron siguiendo los criterios vigentes en el momento del diagnóstico (OMS 2004 y previa) (22), y aplicando criterios establecidos en el TNM vigente al momento del análisis (7ª Clasificación TNM) (104) al no estar disponible la versión más reciente, publicada de manera preliminar en 2016 (105).

Se incluyeron casos exclusivamente intervenidos mediante lobectomía y linfadenectomía reglada, con seguimiento clínico superior a 6 meses y con diagnóstico de:

- a. Adenocarcinoma (ACA)
- b. Carcinoma de células escamosas (CCE)
- c. Carcinoma de célula grande (CCG)

5.2.2 Criterios de exclusión:

- a. Carcinomas adenoescamosos y neuroendocrinos
- b. Casos con tratamiento neoadyuvante
- c. Ausencia de tejido parafinado (se solicitó informe de disponibilidad de muestras del Biobanco del HGUA)
- d. Tratamiento quirúrgico por neumonectomía (con vistas a evitar la morbi-mortalidad del procedimiento quirúrgico).

5.3 Muestra

Muestreo consecutivo, no aleatorio. La revisión de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica (PatWin®) en el período comprendido entre enero de 2002 a diciembre de 2011, identificó 150 casos que cumplían los criterios de inclusión. Teniendo en cuenta las pérdidas por falta de seguimiento se calculó una n de 130 casos. De acuerdo a los datos de supervivencia de cáncer pulmonar correspondiente a los estadios objeto de la investigación, este número es adecuado al tamaño muestral necesario.

Todos los datos obtenidos fueron incorporados a una base de datos informatizada (Microsoft Access). A cada caso se asignó un número de referencia. Tras la revisión de la historia clínica y recogida de variables descriptivas, se eliminó el número de historia clínica y SIP, asegurando la anonimización de los datos. Se solicitó informe de disponibilidad al Biobanco del HGUA, que concedió la cesión del material solicitado y se solicitó la aprobación del Comité de ética.

5.4 Variables a estudio

5.4.1 De identificación y clínicas: Obtenidas mediante revisión de la historia clínica.

- a. Número de referencia en el estudio
- b. Fecha de nacimiento
- c. Sexo
- d. Historia de tabaquismo (años / paquete). Se incluyó en el grupo de “No fumadores” a todos aquellos pacientes exfumadores con abstinencia superior a 10 años.
- e. Fecha de diagnóstico inicial
- f. Localización del tumor
- g. Modalidad de tratamiento quirúrgico: lobectomía o bilobectomía

5.4.2 Variables morfológicas convencionales: Obtenidas tras la revisión de las preparaciones archivadas en el Servicio de A. Patológica.

- a. Tamaño tumoral: según descripción macroscópica de la pieza tamaño y cuantificación del tamaño del componente invasivo mediante microscopía óptica.
- b. Tipo histológico: Se recuperaron las preparaciones teñidas con H&E

correspondientes a cada uno de los casos, seleccionando aquellos con presencia de tumor. Cada caso fue revisado por dos patólogos de manera independiente, mediante microscopía óptica.

De cada caso se revisaron inicialmente 4 preparaciones histológicas y se reclasificaron según los criterios de la OMS 2015 (16), así:

1. Adenocarcinomas: Carcinomas con diferenciación glandular y/o secreción de mucina. Posteriormente fueron subclasificados por subtipos histológicos según los criterios propuestos por el *IASLC Staging Committee* (21) y adoptados por la última edición de la clasificación OMS (16). Se revisaron todas las preparaciones de cada caso, definiendo como patrón predominante el subtipo morfológico presente en porcentaje mayor (**Tabla 10**).

2. Carcinomas de células escamosas: formación de queratina y/o presencia de puentes intercelulares y/o positividad para p63/p40 (16).

3. Carcinomas de célula grande: ausencia de diferenciación glandular o escamosa. En este caso, se realizó un estudio adicional de IHQ (TTF-1, Napsina y p63/p40) para subclasificación. Todos aquellos casos con negatividad para los 3 anticuerpos, se consideraron como CCG. Si TTF-1 y/o Napsina positivos, el tumor era clasificado como ACA. Si p63/p40 positiva, se consideró como CCE.

En caso de discordancia con el diagnóstico previo, se recuperó la totalidad de las preparaciones y se realizó una nueva revisión.

c. Estadio patológico: dado por el TNM (AJCC 2010) (104) (**Tabla 11**)

d. Grado de diferenciación:

Adenocarcinomas: según subtipos histológicos (características arquitecturales) (48) (**Tabla 12**).

Carcinomas de células escamosas: Se subdividieron en tumores queratinizantes y no queratinizantes, según criterios de la OMS (16) (**Tabla 13**) (**Figura 14**).

Tabla 10. Subclasificación de ACA según el *IASLC Staging Committee* (21)

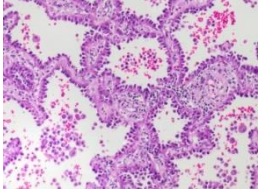
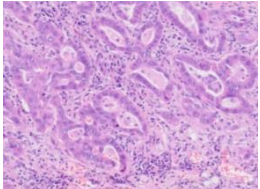
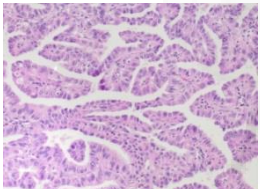
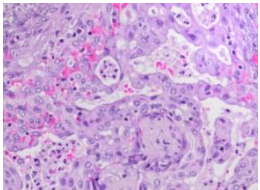
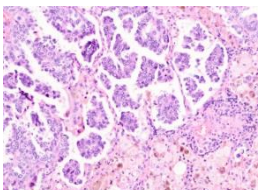
Patrón predominante	Descripción
<p>Lepídico</p> 	<p>Células tumorales de tipo neumocitario relativamente uniformes con crecimiento sobre paredes alveolares con al menos un foco de ACA infiltrante ≥ 5 mm</p>
<p>Acinar</p> 	<p>Mayoría de glándulas, redondas u ovals y/o agregados redondeados de células tumorales con polarización nuclear periférica y citoplasma central sin luz evidente</p>
<p>Papilar</p> 	<p>Glándulas con ejes fibrovasculares centrales (no siendo necesario estroma miofibroblástico).</p>
<p>Sólido</p> 	<p>Sábanas de células neoplásicas con abundante citoplasma y núcleos vesiculares con nucleolo prominente. Ausencia de otros patrones.</p>
<p>Micropapilar</p> 	<p>Papilas sin eje fibrovascular, unidas o desprendidas de las paredes alveolares. Células pequeñas y cuboidales con mínima atipia. Estructuras glandulares pueden “flotar” en espacios alveolares. Frecuentes cuerpos de psammoma.</p>
<p>Subtipos especiales</p>	<p>Mucinoso, coloide, fetal, entérico</p>

Tabla 11. Estadios I, II y III de la clasificación TNM para carcinomas del pulmón (16, 104). Las casillas en rojo señalan los estadios considerados como adecuados para inclusión en el estudio. En azul, estadios excluidos.

Estadio	T	N	M
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0

Tabla 12. Clasificación de adenocarcinomas según grado de diferenciación por subtipos histológicos (48)

Grado	Diferenciación	Patrón de crecimiento
1	Bien diferenciado	ACA in-situ(*), mínimamente invasivo (*) o predominantemente lepidico.
2	Moderadamente diferenciado	Acinar o papilar.
3	Mal diferenciado	Sólido o micropapilar.

(*). Excluidos del estudio

Tabla 13. Características de CCE queratinizantes y no queratinizantes (16)

Carcinoma de células escamosas	Características
Queratinizante	Presencia de queratinización Formación de perlas de queratina Puentes intercelulares
No queratinizante	Puentes intercelulares Marcadores IHQ orientativos de diferenciación escamosa (p40, p63, CK5 o CK5/6. Negatividad para TTF1).

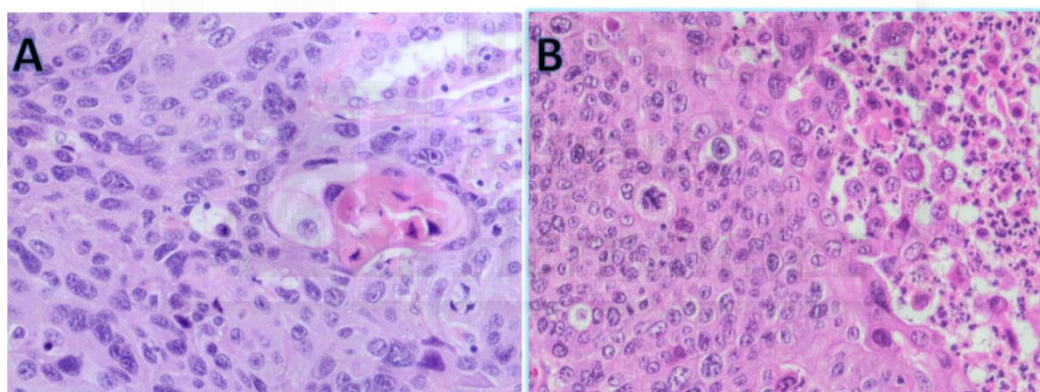


Figura 14. Carcinoma de células escamosas queratinizante (A) y no queratinizante (B)

e. Otras variables histológicas que han señalado capacidad pronóstica (16, 23, 46, 106). Incluyen:

- Invasión pleural: valoración con H&E. En casos dudosos, se emplearon técnicas histoquímicas (orceína para fibras elásticas).
- Invasión vascular: valorada mediante H&E. Definida como presencia de células tumorales en espacios endotelizados.
- Necrosis: valorada mediante H&E.

- Actividad proliferativa: valorada en H&E mediante cuantificación de mitosis en al menos 10 campos de gran aumento (en secciones completas) y con técnicas IHQ cuantificando la expresión de Ki-67.

5.4.3 Variables inmunohistoquímicas: (Tabla 14).

- a. Marcadores IHQ de células madre: CD44, CD44v, CD24, Sox2, ALDH1 y CD133.
- b. Marcadores IHQ de diferenciación: expresión de p63/p40, TTF1 y napsina.
- c. Marcadores de proliferación celular: cuantificación de la expresión de Ki-67
- d. Expresión de p53

Tabla 14. Panel de anticuerpos y controles empleados. Anticuerpos relacionados con expresión de células madre

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial
CD44	DF1485 Monoclonal murino	1:40	Dako
CD44v	CD44v6 Monoclonal murino	1:50	Novocastra
CD24	Ab-2SB3b Monoclonal murino	1:100	Neomarkers
Sox2	NB-110-37235 Monoclonal murino	1:250	Novus
ALDH1	ALDH1A1 clon EP 1933Y Monoclonal, conejo.	1:100	Abcam
CD133	Policlonal, conejo	1:250	Biorbyt

Continúa en la siguiente página

Tabla 14 (continuación). Anticuerpos de diferenciación histológica

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial
TTF-1	8G7G1/1 Monoclonal murino	1:50	Dako
Napsina A	EPR6252 Monoclonal murino	1:250	Abcam
p63	DAK-p63 Monoclonal murino	1:50	Dako
p40	BC28 Monoclonal murino	1:50	Abcam
Ki67	MIB1 Monoclonal murino	1:50	Dako
p53	DO-7 Monoclonal murino	1:100	Dako

5.5. Construcción de las matrices de tejido (TMAs)

Tras la valoración y reclasificación morfológica de los casos, un patólogo identificó sobre las preparaciones teñidas con H&E un área con representatividad tumoral, que fue señalada con un marcador permanente. Posteriormente, cada zona seleccionada se identificó en el bloque de parafina correspondiente y a partir de allí se construyeron las matrices de tejido (TMAs, por sus siglas en inglés, *Tissue Microarrays*) (**Figura 15**). De forma paralela el número de cada caso fue incorporado a una tabla Excel por TMA, que fue editada para la obtención de resultados de cada anticuerpo.

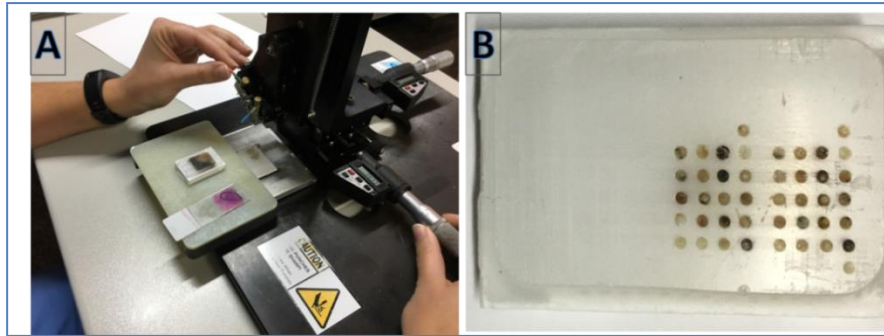


Figura 15. Construcción de TMAs. Tras la selección de un área representativa en H&E se procede a extraer dos cilindros de tejido parafinado (A) y construir los TMAs, cada uno con 20 casos mas dos controles (B). Cada TMA será luego teñido con los diferentes anticuerpos.

Los TMAs permiten estudiar de forma simultánea aproximadamente 40 casos (2 cilindros por caso mas controles), minimizando el número de secciones y el coste en reactivos y proporcionando una reacción inmunohistoquímica uniforme a todos los casos incluidos (107). Para su construcción en nuestro estudio, se tomaron dos cilindros de tejido parafinado de cada tumor, cada uno de 1 mm de diámetro, que fueron llevados a un bloque receptor utilizando un equipo de construcción de matrices de tejido (Beecher instruments).

Cada bloque incluyó un total de 20 casos (2 cilindros por caso) más 2 controles. Se construyeron un total de 8 bloques de matrices. Posteriormente se realizaron secciones de 4 micrometros de espesor a cada bloque de TMA que fueron teñidas en el plazo de 24 - 48 horas para evitar pérdidas de inmunoreactividad.

5.6 Aplicación de técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas fueron realizadas sobre cortes de los TMA, de forma automatizada con equipo Autostainer Link48 (Dako), con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision® (Dako). Se utilizó el panel de anticuerpos ya mencionado (apartado de “Variables inmunohistoquímicas”) (**Tabla 14**). Para la optimización de los anticuerpos se utilizaron controles positivos y negativos consultando bases de datos de expresión tisular.

Los cortes de tejido fueron desparafinados mediante incubación en xilol y rehidratados mediante soluciones descendentes de etanol y agua. La recuperación antigénica se realizo con el equipo PT-Link tratando las secciones con “target retrieval solution Envisión Flex”, con pH alto (9,0). Los anticuerpos primarios fueron

incubados en el Autostainer durante tiempos que oscilaron entre 20 y 30 minutos, dependiendo del ajuste de los anticuerpos.

Metodológicamente, el uso de TMAs es una técnica conveniente para el estudio de numerosos casos; confirmamos la validez de la técnica realizando tinciones para cada anticuerpo en secciones completas de tejido, verificando la tinción homogénea que permitiera establecer una adecuada comparación con el correspondiente TMA (107).

5.7 Valoración de inmunohistoquímica

La valoración de cada anticuerpo se realizó en microscopio óptico de multiobservación, cuantificando la totalidad de las células incluidas en la sección del cilindro (superficie 0,785 mm² por sección) por dos observadores de forma independiente. En total se valoraron 1800 secciones de cilindros.

De manera paralela se incluyeron cortes de tejido como controles positivos para cada anticuerpo (seleccionados según la literatura y la hoja de producto correspondiente) (**Tabla 15**).

5.7.1 Valoración de marcadores de células madre. CD44, CD44v, CD24, ALDH1, Sox-2, CD133.

A continuación se describe el procedimiento para su valoración:

a. Valoración de la tinción: Para cada uno de los anticuerpos seleccionados se revisó la literatura para conocer de antemano cuál era el patrón de tinción esperado (de membrana, citoplasmática, nuclear), y con esta consideración se realizó la valoración de cada TMA (**Tabla 16**).

Tabla 15. Controles empleados y patrón de tinción en tejido control

Anticuerpo	Tejido control	Patrón de expresión
CD44	Urotelio	Positivo en células basales uroteliales
CD44v	Urotelio	Positivo en células basales uroteliales
CD24	Amígdala	Linfocitos de centros germinales positivos
ALDH1	Mama	Epitelio ductal positivo
Sox-2	Carcinoma laríngeo de células escamosas	Positividad nuclear en células tumorales
CD133	Riñón	Positividad en túbulo proximal
TTF-1	Pulmón	Expresión nuclear moderada a intensa en células epiteliales de bronquiolos terminales. Neumocitos tipo II, células Clara y células basales de bronquiolos terminales con expresión nuclear intensa.
Napsina A	Riñón	Células epiteliales de túbulos proximales con tinción granular citoplásmica
p63	Amígdala	Epitelio escamoso superficial positivo. Expresión nuclear leve a moderada en linfocitos aislados.
p40	Placenta	Tinción nuclear débil / moderada en citotrofoblasto, visible incluso a bajo aumento (40x)
Ki67	Amígdala	Tinción nuclear especialmente en centros germinales y capa basal del epitelio
p53	Amígdala	Expresión nuclear débil a moderada en más de 20 % de linfocitos de centros germinales, con positividad menor al 10 % en células B del manto

Tabla 16. Tipo de tinción valorada en cada uno de los anticuerpos seleccionados y punto de corte

Anticuerpo	Tipo de tinción	Punto de corte (%)
CD44	Predominantemente de membrana	10
CD44v	Predominantemente de membrana	10
CD24	Citoplasmática y membranosa circunferencial	10
ALDH1	Citoplasmática	5
Sox-2	Nuclear	10
CD133	Citoplasmática	10

Para cada anticuerpo se consideró la intensidad de expresión de manera cualitativa, valorando primero el patrón de expresión a bajo aumento y posteriormente, con aumento de 400x calificando la intensidad, en cuatro grupos:

- 0 = Ausencia total de expresión
- + = Expresión leve
- ++ = Expresión moderada
- +++ = Expresión intensa

Sólo se consideró como positiva la tinción de ++ /+++ (expresión moderada e intensa). Los casos con 0 y + fueron considerados como negativos. Sólo se valoró tinción observada en células neoplásicas; aquella identificada en el estroma, macrófagos y celularidad inflamatoria fue valorada como inespecífica siendo excluida del análisis.

b. Cuantificación de células tumorales positivas: expresada en porcentaje. Se cuantificó la cifra media observada por dos observadores y en caso de discrepancia >10%, se reevaluó el caso. El estudio de expresión se realizó en la totalidad de las células tumorales incluidas en los cortes de TMA.

El análisis inicial mostró que la construcción de un score combinando intensidad y porcentaje de células positivas no mejora los datos de correlación. Debido a esto, se decidió emplear un punto de corte basado sólo en el porcentaje de células teñidas con una intensidad 2 y 3+. Cualquier célula con intensidad 0 / 1+ se consideró negativa.

c. *Selección del punto de corte:* considerando la ausencia de valores universalmente aceptados para el estudio IHQ de marcadores de CMCs, se estudió la mediana de los resultados así como puntos de corte reportados en la literatura.

5.7.2 *Valoración de marcadores de diferenciación histológica (p63/p40, TTF1 y napsina).* Los anticuerpos empleados en caso de diagnóstico inicial de CCG se describen en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Criterios para valoración de anticuerpos de diferenciación histológica. Definición de casos positivos

Anticuerpo	Localización de la tinción	Intensidad	Expresión (focal versus difusa)
p63	Nuclear	Cualquiera (débil / moderada / intensa)	Cualquiera (focal y/o difusa)
p40	Nuclear	Cualquiera (débil / moderada / intensa)	Cualquiera (focal y/o difusa)
TTF1	Nuclear	Cualquiera (débil / moderada / intensa)	Cualquiera (focal y/o difusa)
Napsina	Citoplasmática	Al menos moderada / intensa)	Cualquiera (focal y/o difusa)

5.7.3 *Valoración de marcadores de proliferación celular (Ki67):* valorada en TMA en al menos 400 núcleos (cada cilindro de TMA tiene entre 300 a 1000 células), evitando el análisis exclusivo de áreas de elevada concentración de células positivas (“*hot spots*”).

La selección del punto de corte para Ki67 en CPCNP varía en la literatura (51); algunos estudios reportan el uso de la mediana como valor discriminatorio. Debido a la falta de consenso en cuál es el óptimo para la valoración de tumores pulmonares (52, 53), en un primer paso se valoraron los resultados en combinación con la cuantificación de mitosis y p53. Tras verificar la concordancia de los resultados con estos tres marcadores, se seleccionó 30% como el valor con mayor capacidad discriminatoria (proliferación alta $\geq 30\%$ versus baja $< 30\%$).

5.7.4 *Valoración de expresión de p53:* expresión nuclear moderada e intensa (2 y 3+) valorada en TMA en al menos 400 núcleos. Expresada en porcentaje de células positivas. Los puntos de corte en la literatura varían, entre 10% y 30% (53). Se optó por un corte de 30% para lograr mayor especificidad.

5.8 Variables de resultado

- a. Periodo libre de enfermedad tras el tratamiento quirúrgico: tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica y el primer episodio de recidiva de la enfermedad
- b. Supervivencia global: tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica y el éxitus

5.9. Análisis de datos

5.9.1 *Estudio descriptivo:* Para las variables cualitativas se utilizó la frecuencia relativa en porcentajes y para las cuantitativas, la media y la desviación estándar. La evaluación de la distribución de datos se realizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la correlación de las variables cuantitativas inmunohistoquímicas se aplicó el método de Pearson y de Spearman.

En el caso de variables cualitativas se midió la asociación mediante la prueba del Chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher en caso de datos reducidos en las tablas de contingencia.

5.9.2 Análisis univariante de supervivencia: se aplicó el método Kaplan-Meier. El cociente de riesgos instantáneos (“Hazard ratio”) y el intervalo de confianza (95%) se obtuvieron mediante el análisis de regresión de Cox. Las curvas de supervivencia se compararon con la prueba de rangos logarítmicos (Log rank). Para el análisis multivariante se aplicó el modelo de regresión de Cox con las variables que presentaron en el análisis univariante una $p < 0,1$.

Para el contraste de las hipótesis descritas anteriormente se utilizó una $p < 0,05$.

El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows V.20.

5.10. Medios disponibles y financiación

El grupo de estudio de tumores pulmonares del HGUA forma parte del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) y ha recibido financiación de la Fundación para la Investigación Biomédica del HGUA (posteriormente adscrita a Fisabio y actualmente parte de ISABIAL).

Los casos analizados forman parte de la colección de tumores pulmonares del grupo de estudio de cáncer de pulmón del HGUA. Se contó con financiación de la Fundación para la Investigación Biomédica del HGUA, asignada al proyecto “Expresión de marcadores de células madre en carcinoma pulmonar de célula no pequeña en estadios iniciales: significado pronóstico” (Ref. UGP-14-127) (**Tabla 18**).

El análisis inmunohistoquímico se realizó en el Servicio de Patología del HGUA, que dispone del equipamiento e infraestructura necesaria: *Tissue micro-array*, microtomos, inmunoteñidores automáticos, equipos de microscopía multiobservación y digitalización de imagen.

Tabla 18. Gastos asociados al proyecto

Descripción del gasto	Importe bruto
Gastos de personal (no colaboradores)	
Contratación de TEAP* (1 mes a tiempo parcial, para preparación de TMA y realización de técnicas IHQ)	500
Material fungible:	
Anticuerpos (8x500)	4000
Sistema de detección (Envision Flex, Dako)	2800
Gastos gestión Biobanco (2 punch x 50 casos)	
	200
Total	7500

* TEAP: Técnico de Anatomía Patológica. La totalidad de las técnicas fue realizada por el mismo técnico con experiencia en construcción de TMA.

5.11 Dificultades y limitaciones

Del total de casos identificados se excluyeron 10% por falta de tejido disponible; adicionalmente, algunos casos aislados se perdieron en el procesamiento.

5.12 Aspectos éticos

En todos los pacientes se realizaron estudios IHQ sobre los TMA con preservación del bloque en parafina original. Las muestras de tumor necesarias para la realización del proyecto forman parte de la COLECCIÓN CARCINOMA DE PULMÓN del Biobanco del HGUA. Se cuenta con un informe de disponibilidad de muestras del Biobanco, el cual autorizó su cesión. Se solicitó y obtuvo autorización de los Comités ético y de investigación a los que está adscrito el Biobanco



6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Análisis descriptivo de variables clínico patológicas

Tras la revisión de la base de datos, 150 casos cumplieron los criterios de inclusión. De estos, 10 casos fueron excluidos por diversos motivos (ausencia de seguimiento, ausencia de tejido tumoral suficiente en los bloques de parafina o bien por no disponer el Biobanco de consentimiento informado) (**Figura 16**).

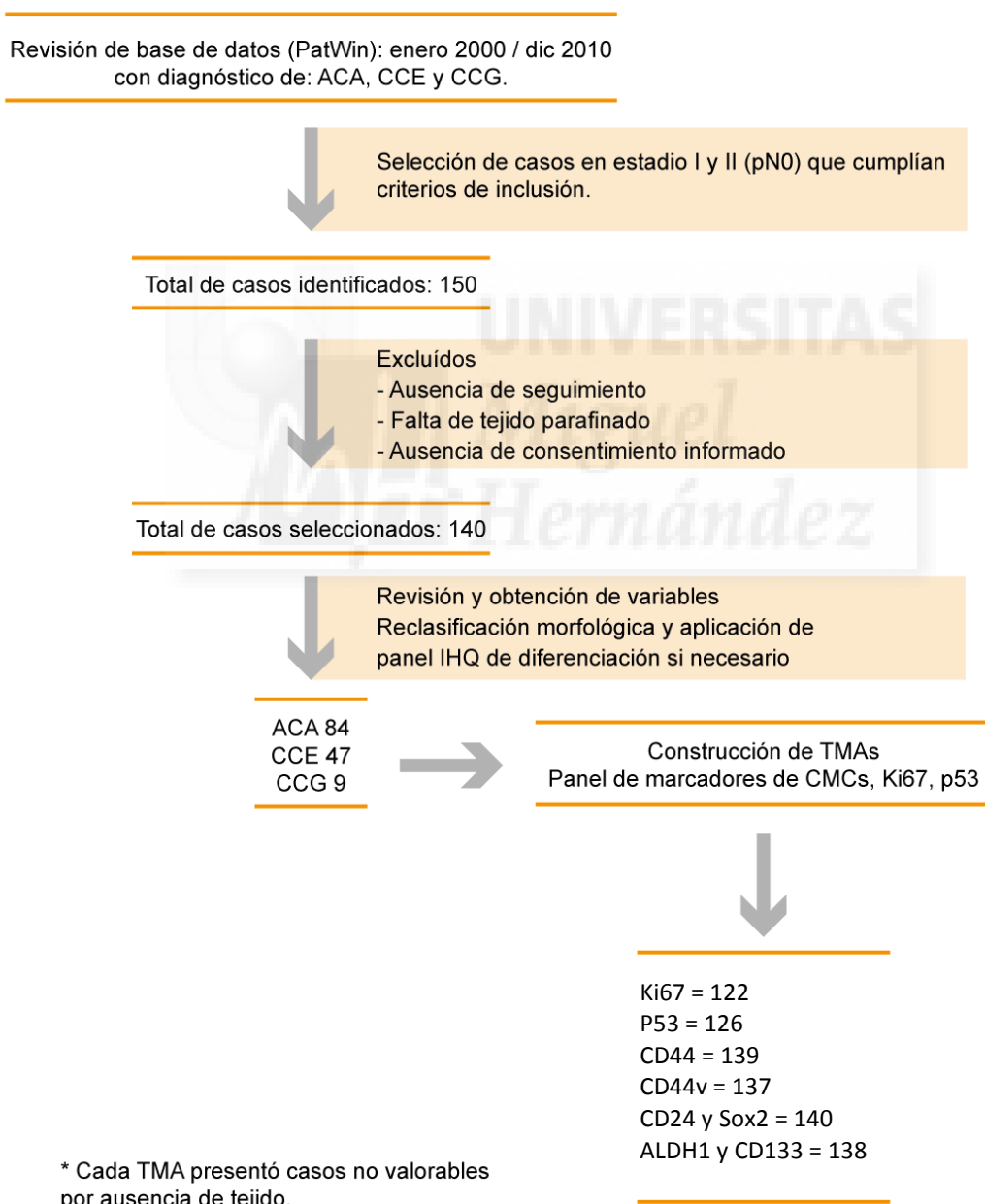


Figura 16. Algoritmo de trabajo.

Un total de 140 casos fueron incluidos en el análisis (80% hombres y 20% mujeres), con edades comprendidas entre 44 y 85 años (media de 67 años). Los pacientes eran mayoritariamente fumadores (rango de 9-120 años/paquete). Por estadios patológicos, la mayoría (46%) correspondían a estadio IA. El tamaño medio tumoral fue de 36 mm (rango entre 9 – 100 mm, con mediana de 33 mm) (**Tabla 19**). La media de seguimiento fue de 69 meses (rango de 6 a 161 meses, con una mediana de 71 meses).

Tabla 19. Casos identificados. Características clínicas y patológicas (n= 140)

Variable	n (%)
Edad (años)	
< 60	30 (21%)
≥ 60	110 (79%)
Sexo	
Hombre	112 (80%)
Mujer	28 (20%)
Fumador	
Si	126 (90%)
No	14 (10%)
Tamaño tumoral	
<30 mm	53 (38%)
≥30 mm	87 (62%)
Estadio	
IA	65 (46%)
IB	45 (32%)
II, NO	30 (22%)
Tipo histológico	
ACA	84 (60%)
CCE	47 (34%)
CCG	9 (6%)
Tasa de supervivencia	
1 año	94%
2 años	85%
5 años	66%
Recaída (a 5 años)	
Si	46 (32,9%)
No	94 (67,1%)

ACA: Adenocarcinomas. CCE: Carcinomas de Células Escamosas. CCG: Carcinomas de célula grande.

La clasificación inicial considerando sólo parámetros morfológicos mostró un total de 25 casos de CCG. Tras el estudio IHQ (TTF1, p63 y marcadores neuroendocrinos - CD56, cromogranina y sinaptofisina-), 16 de los casos fueron reclasificados (**Figura 17**).

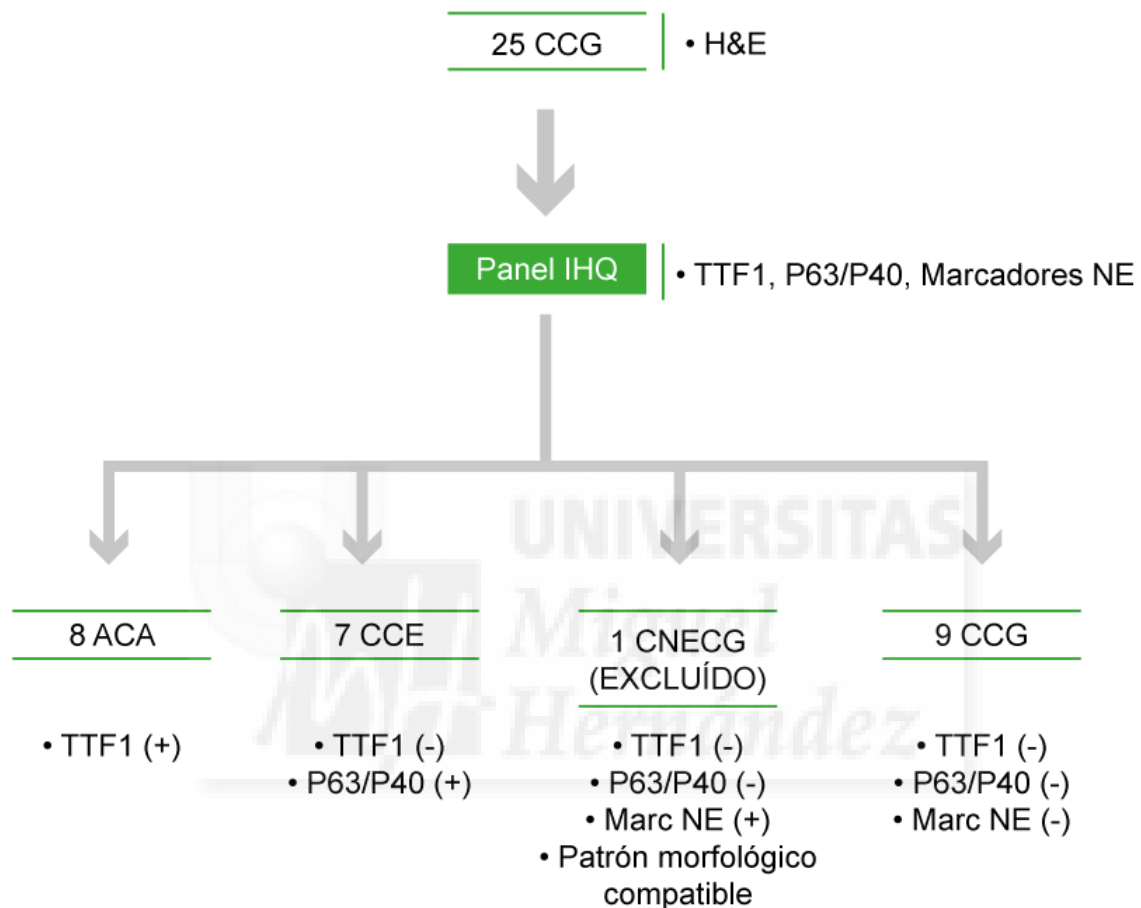


Figura 17. Total de casos clasificados como CCG tras revisión morfológica (H&E) inicial (n=25) y reclasificación tras aplicación de panel IHQ.

*CCG: Carcinoma de célula grande. ACA: Adenocarcinoma. CCE: Carcinoma de células escamosas. CNECG: Carcinoma neuroendocrino de célula grande.

6.1.1 Distribución por tipos histológicos:

a. Adenocarcinomas: La serie mostró predominio de ACA (60%) (**Figura 18**). De estos, 61 casos (73%) correspondían a hombres y 23 (27%) a mujeres, con un promedio de edad de 66 años (rango de 46-80 años). El porcentaje de fumadores entre los ACA fue de 82%.

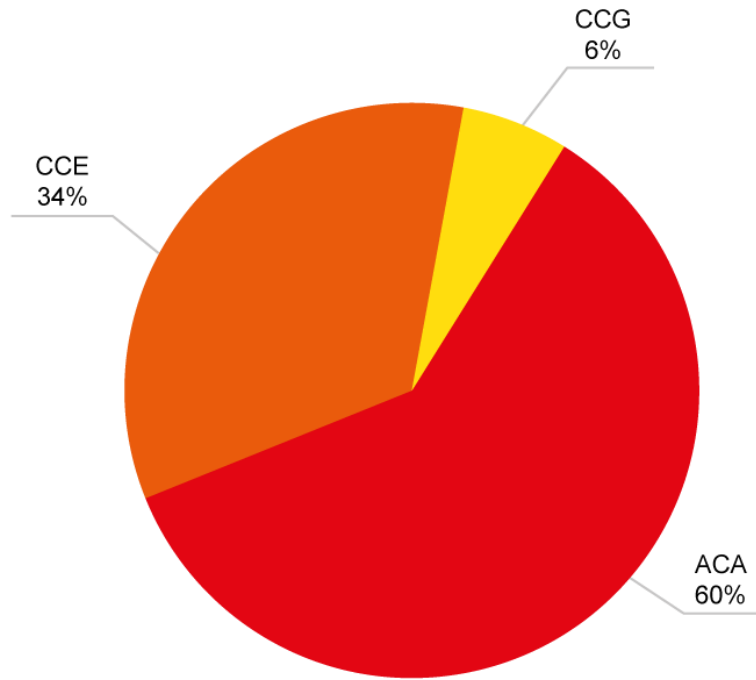


Figura 18. Distribución de la serie por tipos histológicos

ACA: Adenocarcinoma; CCE: Carcinoma de Células Escamosas; CCG: Carcinoma de Célula grande

Del total de 84 ACA, 60 correspondían a tumores de patrón no sólido (45 de patrón acinar/papilar, 11 de patrón predominantemente lepidico y 4 tumores mucinosos) y 24 a tumores de patrón sólido (**Figura 19**).

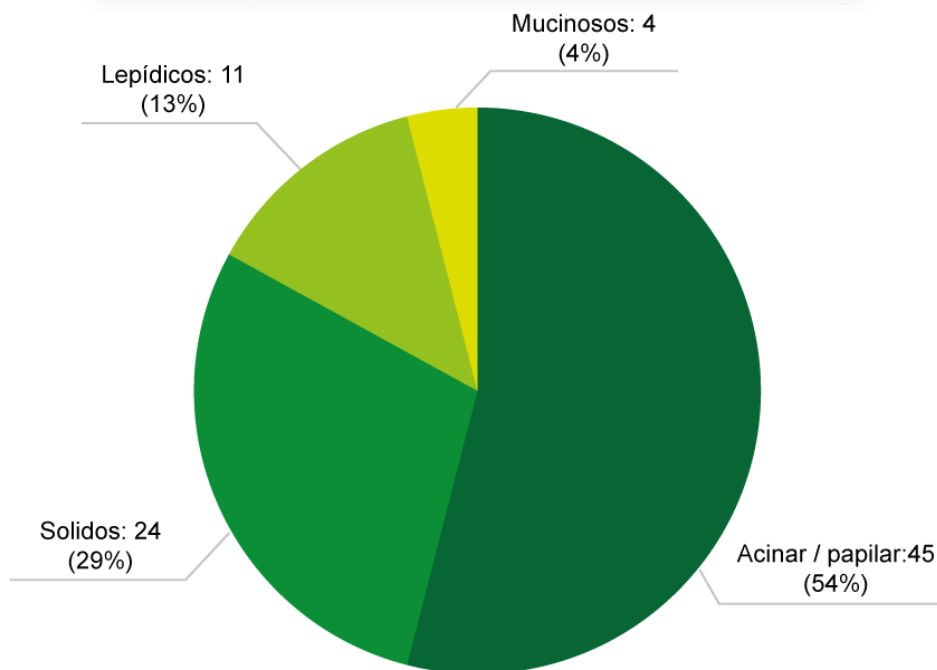


Figura 19. Distribución de ACA por subtipos histológicos

b. Carcinomas de Células Escamosas: Se identificaron un total de 47 CCE (34% del total de casos incluidos). 33 (70%) correspondían a tumores queratinizantes y 14 (30%) a neoplasias no queratinizantes, con negatividad para TTF1 y expresión de p63/p40.

En los CCE se observó un predominio (92%) de pacientes de sexo masculino ($p=0,028$). Todos los casos correspondían a fumadores, ($p=0,005$) (**Tabla 20**).

c. Carcinomas de Célula Grande: Como se mencionó antes, tras el estudio IHQ inicial fue posible reclasificar 15 de 25 tumores inicialmente considerados como carcinomas indiferenciados, así como excluir un caso con diferenciación neuroendocrina. Un total de 9 casos (6%) del total de tumores no mostraron ningún parámetro (morfológico / IHQ) que permitiera reclasificarlo como ACA / CCE, siendo considerados como CCG. La **Tabla 20** resume la distribución de las diversas variables clínico-patológicas en relación con los 3 grupos histológicos; se encontraron diferencias significativas en cuanto a distribución por sexo ($p= 0,028$), consumo de tabaco ($p= 0,005$), tamaño tumoral ($p= 0,032$) y grado nuclear ($p= 0,032$) entre los diversos grupos.

Tabla 20. Tipos histológicos y variables clínico patológicas

Variable clínico - patológica	ACA	CCE	CCG	p
<i>Edad</i>				
< 60 (n = 30)	23%	17%	33%	ns
≥ 60 (n = 110)	77%	83%	67%	
<i>Sexo</i>				
Hombres (n = 112)	73%	91%	89%	0,028*
Mujeres (n = 28)	27%	9%	11%	
<i>Tabaquismo</i>				
Si (n = 124)	83%	100%	100%	0,005*
No (n = 14)	17%			
<i>Tamaño (mm)</i>				
< 30 (n = 53)	46%	23%	33%	0,032*
≥ 30 (n = 87)	54%	77%	67%	

Continúa en la siguiente página

Tabla 20. Continuación

<i>Grado nuclear</i>				
1 (n = 22)	24%	4%	0	
2 (n = 80)	52%	64%	67%	
3 (n = 38)	24%	32%	33%	0,032*
<i>Estadio</i>				
IA (n = 65)	52%	36%	45%	
IB (n = 45)	31%	24%	33%	
II pN0 (n = 30)	17%	30%	22%	ns

6.1.2 *Variables relacionadas con proliferación celular*: El número de mitosis por 10 CGA no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos histológicos. El rango de actividad proliferativa, cuantificada mediante Ki67 (posible de valorar en 122 de los 140 casos) estuvo entre 2% y 75% (mediana de 32%); los casos se distribuyeron de manera relativamente uniforme entre 46% con bajo Ki67 y 54% con Ki67 elevado. Los CCG y CCE presentaron mayor número de mitosis y mayor Ki67 que los ACA (p= 0,000). La expresión de p53 fue valorable en 126 casos del total y el mayor nivel de expresión se observó en los CCE (p= 0,001) (**Tabla 21**).

El cálculo de correlación entre número de mitosis por CGA y Ki67 empleando la r de Spearman fue de 0,50 (p= 0,000); entre número de mitosis y p53, de 0,17 (p=0,05) y entre Ki67 y p53, de 0,23 (p=0,10).

Tabla 21. Cuantificación de mitosis y expresión de Ki67 y p53 (en todos los tipos histológicos).

Variable clínico - patológica	ACA (n y %)	CCE (n y %)	CCG (n y %)	p
<i>Mitosis x 10 cga</i>				
< 10 (n = 64)	55 (65%)	9 (19%)	0	
≥ 10 (n = 76)	29 (35%)	38 (81%)	9 (100%)	0,000*
<i>Ki67</i>				
< 30 (n = 56)	46 (65%)	9 (21%)	1 (11%)	
≥ 30 (n = 66)	25 (35%)	33 (79%)	8 (89%)	0,000*
<i>p53</i>				
< 30 (n = 60)	44 (59%)	10 (24%)	6 (67%)	
≥ 30 (n = 66)	31 (41%)	32 (76%)	3 (33%)	0,001*

6.2 Análisis descriptivo de la expresión IHQ de marcadores de células madre

Los tumores fueron dicotomizados en casos “positivos” (expresión superior o igual al punto de corte) y “negativos” (menor que el punto de corte). Se consideraron resultados con significación estadística aquellos con $p \leq 0,05$.

6.2.1 *CD44*: Del total de 140 casos, en uno no fue posible la valoración de CD44 (ausencia de tumor en TMA). En parénquima pulmonar no tumoral observamos expresión de CD44 en células basales bronquiales, con expresión leve en neumocitos.

En las secciones de tejido tumoral, 60 casos (43%) mostraron positividad para CD44 (tinción de membrana, con punto de corte $\geq 10\%$) mientras que en 79 casos (57%) la expresión fue negativa (**Figura 20**).

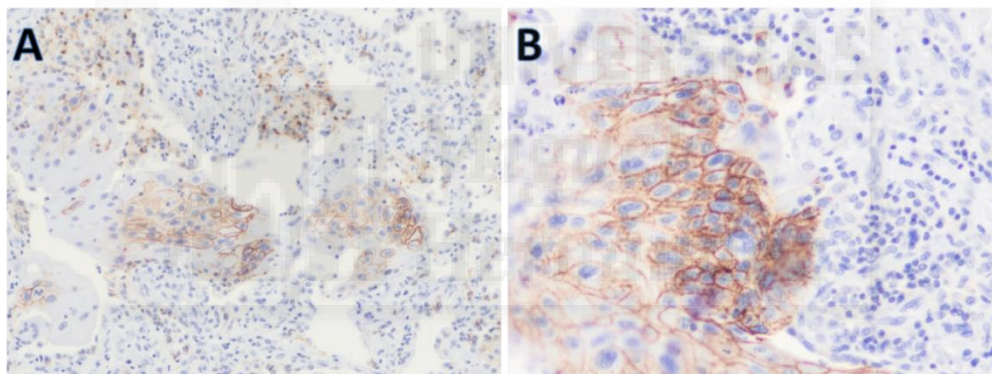


Figura 20. Patrón de expresión de CD44 en células tumorales. (A) TMA (40x). (B) CCE, tinción de membrana (400x)

Los casos positivos correspondían mayoritariamente a varones con edades superiores a 60 años (sin diferencias estadísticamente significativas) (**Tabla 22**). Tampoco se observó asociación con tabaquismo, tamaño tumoral o estadio.

Tabla 22. Expresión de CD44 (todos los tipos histológicos) y correlación con variables patológicas (n= 139)

Variables clínico-patológicas	CD44 ≥10 (n y %)	p
<i>Edad</i>		
< 60	10/30 (33%)	ns
≥ 60	50/109 (46%)	
<i>Sexo</i>		
Hombre	53/111 (47%)	0,03*
Mujer	7/28 (25%)	
<i>Fumador</i>		
Si	55/125 (44%)	ns
No	4/14 (29%)	
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	25/65 (39%)	ns
≥ 30 mm	35/74 (47%)	
<i>Estadio</i>		
IA	25/65 (38%)	ns
IB	18/44 (41%)	
II	17/30 (57%)	

a. Variables proliferativas y expresión de CD44: Se observó mayor expresión de CD44 en tumores con ≥ 10 mitosis x 10cga ($p = 0,013$), al igual que en casos con Ki67 $\geq 30\%$ ($p = 0,000$) (**Tabla 23**).

Tabla 23. Expresión de CD44 y relación con variables proliferativas y expresión de p53

Variables clínico-patológicas	CD44 ≥10 (n y %)	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	20/63 (32%)	0,013*
≥ 10	40/76 (53%)	
<i>Ki67</i>		
< 30%	15/66 (23%)	0,000*
≥ 30%	46/75 (61%)	
<i>P53</i>		
< 30	20/66 (30%)	0,003*
≥ 30	41/73 (56%)	

b. Expresión de CD44 por tipos histológicos: CD44 se expresó predominantemente en CCE ($p= 0,000$) (43/47 casos con expresión alta -92%-) (**Figura 21**). En el grupo de ACA y CCG, sólo en una minoría de casos se observó expresión elevada (16/83 ACA y 1/9 CCG).

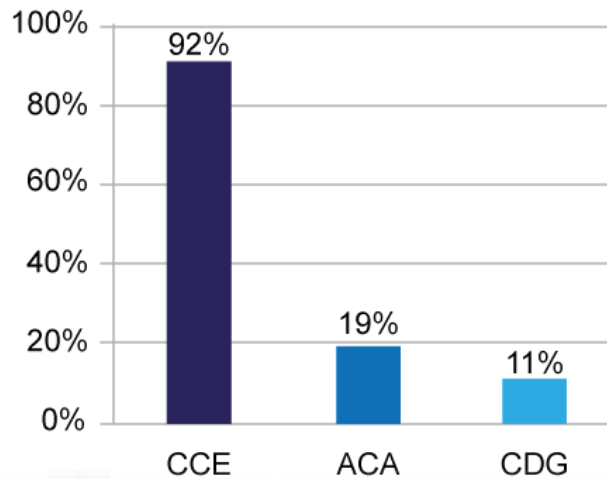


Figura 21. Expresión elevada de CD44 por tipos histológicos ($p= 0,000$)

Los CCE queratinizantes mostraron mayor expresión de CD44 que los no queratinizantes, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,36$) (**Tabla 24**) (**Figura 22**). En el análisis por subgrupos histológicos, en los CCE no se identificó ninguna relación estadísticamente significativa entre la expresión de CD44 y las diferentes variables clínico-patológicas (edad, sexo, tabaquismo, tamaño tumoral o estadio), ni tampoco con variables relacionadas con proliferación (Ki67 o índice mitótico) o expresión de p53.

Tabla 24. Diferencias en expresión de CD44 por subtipos de CCE ($p = ns$)

Subtipo histológico	CD44 ≥ 10 n y %
CCE queratinizante	31 / 33 (94%)
CCE no queratinizante	12/14 (86%)

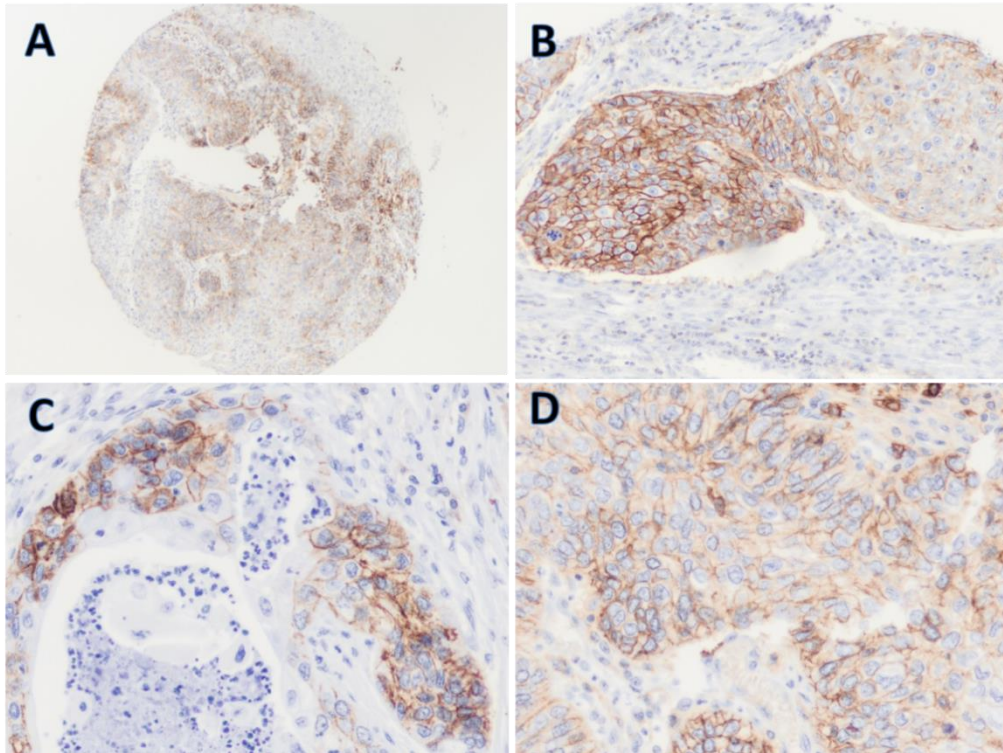


Figura 22. Expresión de CD44 en CCE queratinizante (A) TMA, 40x. B 100x. (C) 200x y (D) 200x.

En los ACA, CD44 tampoco mostró asociación con las diversas variables clínico-patológicas ni con los subtipos morfológicos ($p = ns$). Al explorar la expresión de CD44 en el subgrupo de ACA mal diferenciados (patrón sólido), tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = ns$) (**Figura 23**).

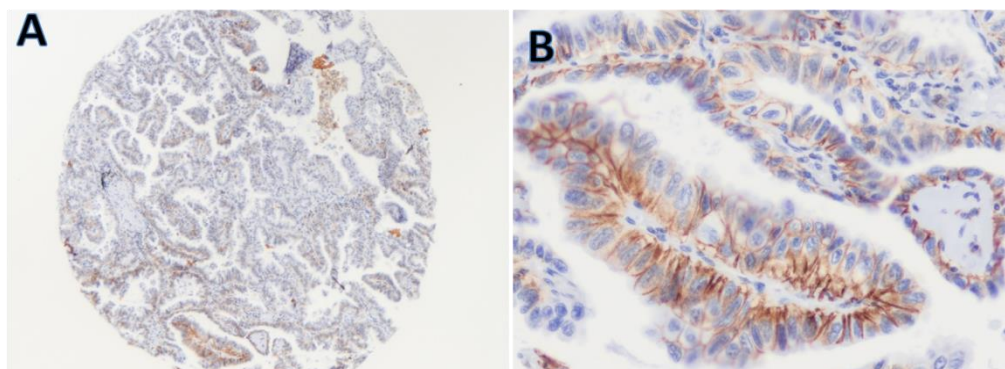


Figura 23. Expresión de CD44 en ACA (A) TMA, 40x. B 400x.

6.2.2 *CD44v*: En parénquima pulmonar no tumoral, observamos expresión de *CD44v* en células basales bronquiales y neumocitos hiperplásicos (**Figura 24**).

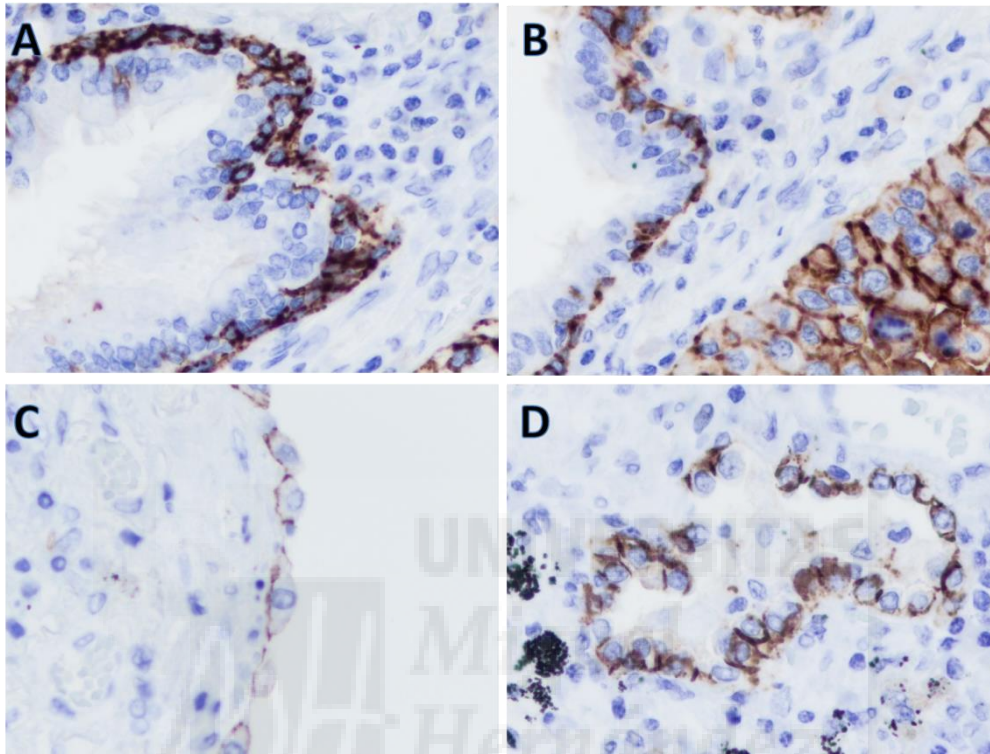


Figura 24. Expresión de *CD44v* en parénquima pulmonar no neoplásico. (A) y (B) positividad de membrana en células basales bronquiales. 200x y 400x. (C) y (D) positividad en neumocitos hiperplásicos 400x.

En pulmón tumoral, del total de casos en que fue posible valorar *CD44v* (n=137), 74 (54%) fueron positivos ($CD44v \geq 10$), sin diferencias entre edad, sexo o tabaquismo (**Tabla 25**).

Tabla 25. Expresión de CD44v elevada (en todos los tipos histológicos) y correlación con variables patológicas

Variables clínico-patológicas	CD44v ≥10 (n y %)	p
<i>Edad</i>		
< 60	18/30 (60%)	ns
≥ 60	56/107 (52%)	
<i>Sexo</i>		
Hombre	60/110 (55%)	0,08
Mujer	14/27 (52%)	
<i>Fumador</i>		
Si	65/123 (52%)	ns
No	8/14 (62%)	
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	33/65 (51%)	ns
≥ 30 mm	41/72 (57%)	
<i>Estadio</i>		
IA	32/65 (49%)	ns
IB	25/43 (58%)	
II	17/29 (59%)	

a. Variables proliferativas y expresión de CD44v: Se observó mayor expresión de CD44v en tumores con ≥ 10 mitosis x 10cga ($p= 0,038$). Al valorar la proliferación mediante Ki67, se confirma esta diferencia de expresión con valores de significación estadística (alta expresión de CD44v en 69% de tumores con Ki67 elevado) ($p= 0,000$) (**Tabla 26**).

No se observaron diferencias en cuanto a expresión de CD44v en relación con p53.

Tabla 26. Expresión de CD44v y relación con variables proliferativas y expresión de p53

Variables clínico-patológicas	CD44v ≥10 (n y %)	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	28/63 (44%)	0,038*
≥ 10	46/74 (62%)	
<i>Ki67</i>		
< 30%	23/63 (36%)	0,000*
≥ 30%	51/74 (69%)	
<i>P53</i>		
< 30	29/65 (45%)	0,09
≥ 30	43/72 (60%)	

b. Expresión de CD44 por tipos histológicos: A semejanza de CD44, se observó una expresión predominante de CD44v en CCE (42 casos positivos de un total de 45, 93%) (p= 0,000). En los ACA, CD44v fue positiva en 29/83 casos y en CCG en 3 de 9 casos (**Figura 25**).

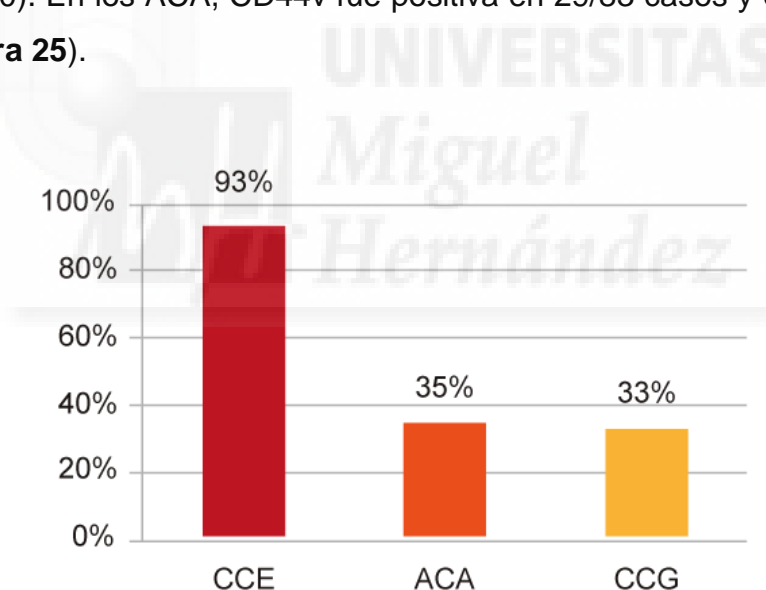


Figura 25. Diferencias en expresión elevada de CD44v por tipos histológicos (p= 0,000)

El análisis por subgrupos histológicos no demostró diferencias de expresión de CD44v en CCE en tumores queratinizantes *versus* no queratinizantes (p = ns).

Tampoco se observaron diferencias en expresión en relación con el resto de variables clínico-patológicas (edad, sexo, tabaquismo, tamaño tumoral o estadio) (**Figura 26 y Tabla 27**).

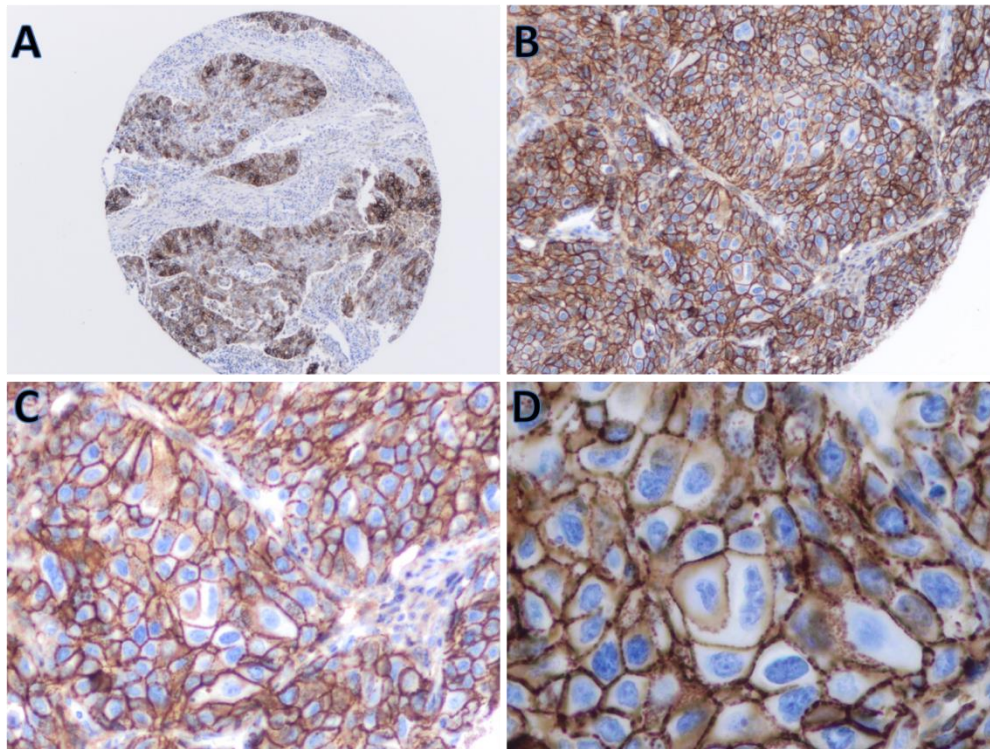


Figura 26. Expresión de CD44v en CCE. Tinción de membrana. (A) TMA, 40x. (B) 100x. (C) 200x. (D) 400x

Tabla 27. Diferencias en expresión de CD44v por subtipos de CCE ($p = ns$)

Subtipo histológico	Expresión elevada (n y %)
CCE queratinizante	29 / 31 (94%)
CCE no queratinizante	13/14 (93%)

En los ACA, CD44v tampoco mostró asociación con las diversas variables clínico-patológicas ni con los subtipos morfológicos ($p = ns$). El análisis por subgrupos en ACA mal diferenciados (patrón sólido), tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,7$) (**Figura 27 y Tabla 28**).

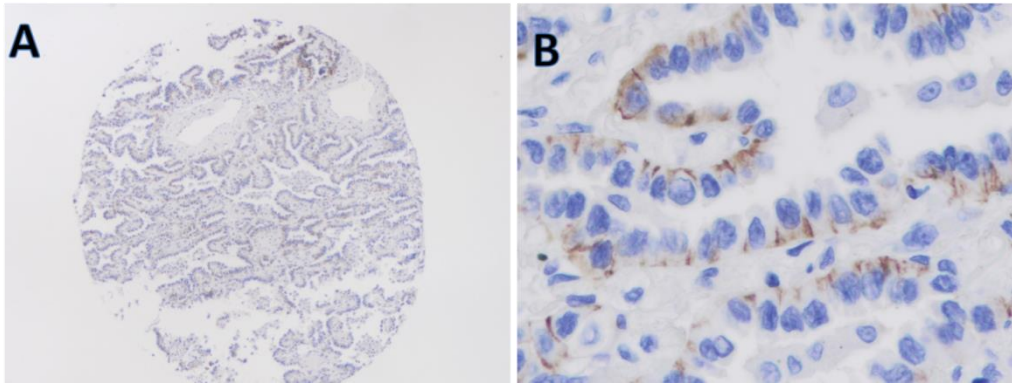


Figura 27. Expresión de CD44v en ACA. (A) CD44v en TMA, 40x. (B) ACA, patrón acinar. 400x

Tabla 28. Expresión de CD44v en ACA de patrón sólido (p=ns)

Expresión de CD44v	ACA patrón sólido (n y %)
Positiva (≥ 10)	9 / 24 (38%)
Negativa (< 10)	20/59 (34%)

6.2.3 CD24: En parénquima pulmonar no tumoral, observamos expresión luminal en los neumocitos y negatividad en el epitelio bronquial (**Figura 28**).

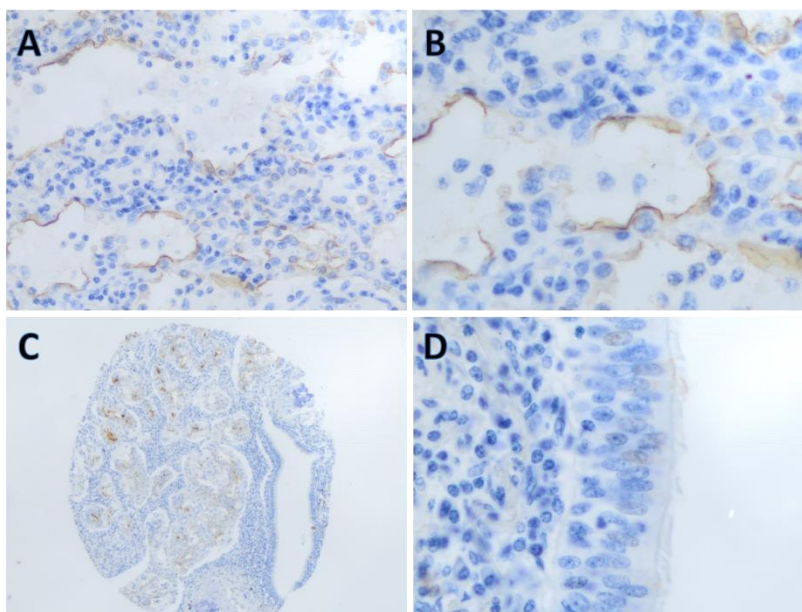


Figura 28. Expresión de CD24 en parénquima pulmonar no tumoral. (A) y (B) expresión luminal en neumocitos, 100x y 200x. (C) y (D) Negatividad en epitelio bronquial, TMA, 40x y 400x.

En áreas tumorales se observaron 3 patrones de tinción para CD24: de membrana, citoplasmático, y luminal (**Figura 29**).

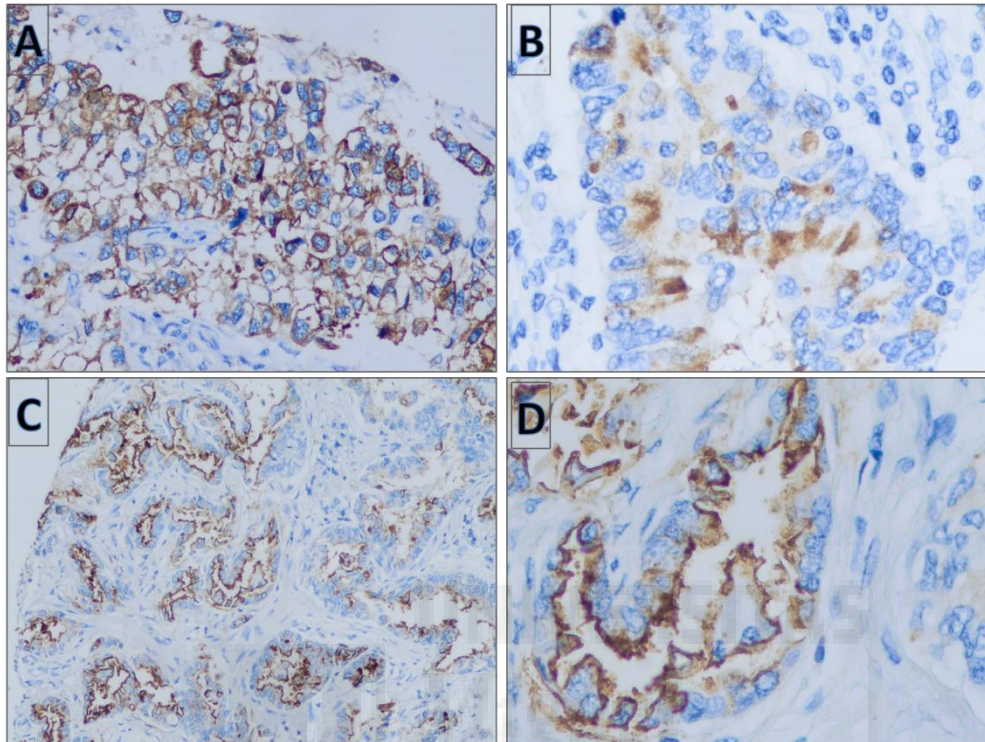


Figura 29. Expresión de CD24 en áreas tumorales; se identificaron 3 diferentes patrones de tinción. **(A)**. Patrón de membrana (200x). **(B)**. Tinción citoplasmática (400x). **(C)**. Patrón de tinción luminal (100x) y **(D)** (400x)

Del total de casos en que fue posible la valoración (n=140), 76 (54%) fueron negativos ($CD24 \leq 10$), sin diferencias significativas entre edad, sexo, tabaquismo, tamaño y estadio (**Tabla 29**).

a. Variables proliferativas y expresión de CD24: No se observaron diferencias significativas en cuanto a expresión de CD24 y número de mitosis. Con Ki67, tumores con menor índice proliferativo mostraron mayor expresión de CD24 ($p=0,04$); de igual manera, la expresión de CD24 fue más frecuentes en casos negativos para p53 (**Tabla 30**).

Tabla 29. Expresión de CD24 (≥ 10) en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas

Variables clínico-patológicas	CD24 ≥ 10 (n y %)	p
<i>Edad</i>		
< 60	15/30 (50%)	ns
≥ 60	49/110(45%)	
<i>Sexo</i>		
Hombre	47/112 (42%)	0,075
Mujer	17/28 (61%)	
<i>Fumador</i>		
Si	55/126 (44%)	ns
No	8/14 (57%)	
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	30/65 (46%)	ns
≥ 30 mm	41/75 (45%)	
<i>Estadio</i>		
IA	31/65 (48%)	ns
IB	20/45 (44%)	
II	13/30 (43%)	

Tabla 30. Expresión de CD24 y relación con variables proliferativas y expresión de p53

Variables clínico-patológicas	CD24 ≥ 10 (n y %)	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	32/64 (50%)	ns
≥ 10	32/76 (42%)	
<i>Ki67</i>		
< 30%	36/65 (55%)	0,04*
$\geq 30\%$	29/75 (38%)	
<i>P53</i>		
< 30	38/67 (57%)	0,035*
≥ 30	28/73 (38%)	

Expresión de CD24 por tipos histológicos: Se observó una expresión predominante de CD24 en ACA (expresión elevada en 48 de 84 casos, 57%) ($p= 0,001$) (**Figura 30**). En CCE la expresión elevada de CD24 se identificó en 11/47 casos y en CCG en 5 de 9 casos.

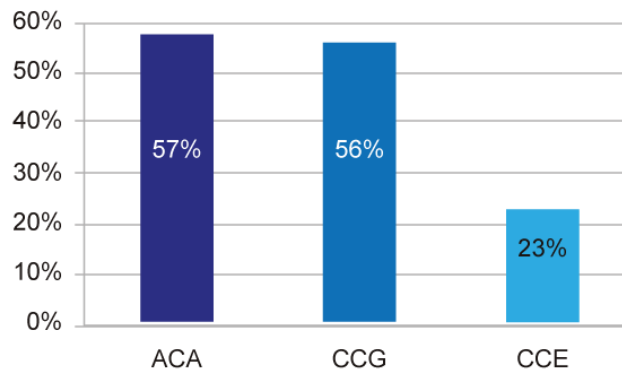


Figura 30. Diferencias en expresión elevada de CD24 por tipos histológicos ($p= 0,001$)

En los ACA, CD24 no mostró asociación con las diversas variables clínico-patológicas ni con los subtipos morfológicos ($p = ns$) (**Figura 31**).

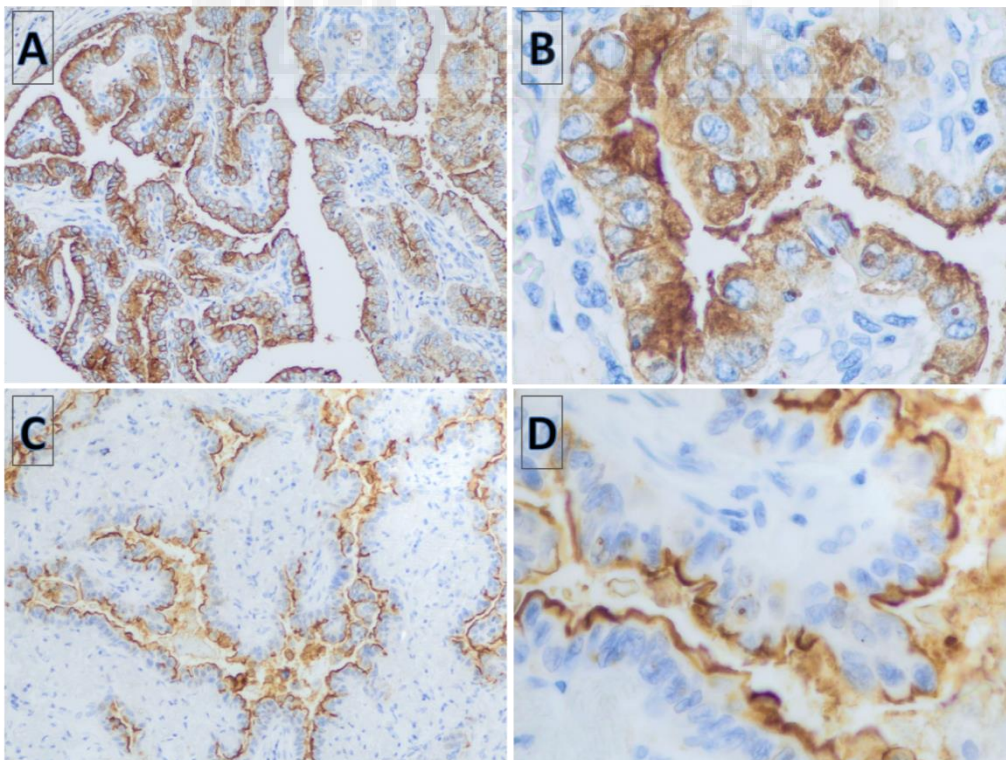


Figura 31. Expresión de CD24 en ACA. (A) y (B). Patrón citoplasmático y de membrana, 200x y 400x. (C) y (D) Patrón de expresión luminal, 200x y 400x.

El análisis por subgrupos en ACA mal diferenciados (patrón sólido), tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,4$) (**Tabla 31**).

Tabla 31. Expresión de CD24 en ACA ($p = ns$)

Patrón histológico	CD24 elevada ($\geq 10\%$)
ACA sólido	12 / 24 (50%)
ACA no sólido	36/60 (60%)

En el grupo de CCE, no se encontraron diferencias en cuanto a expresión de CD24 en tumores queratinizantes *versus* no queratinizantes ($p = 0,19$) (**Figura 32**) (**Tabla 32**). Tampoco se observaron diferencias en expresión en relación con el resto de variables clínico-patológicas (edad, sexo, tabaquismo, tamaño tumoral o estadio).

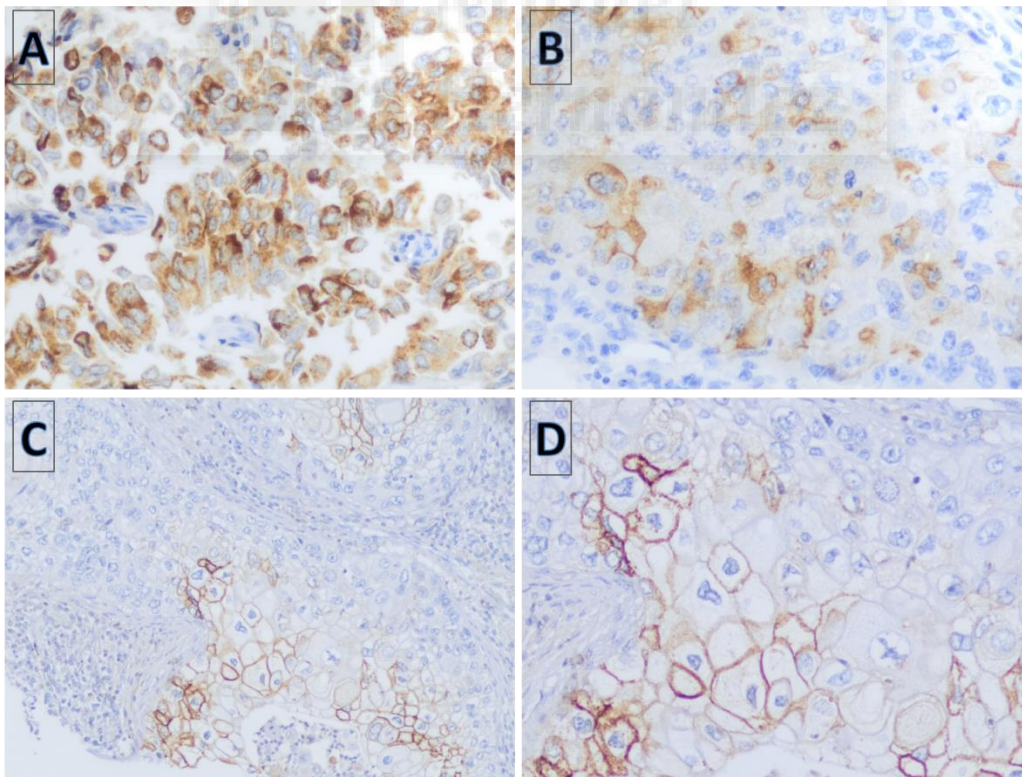


Figura 32. Expresión de CD24 en CCE. (A) y (B) Expresión citoplasmática, 200x. (C) y (D) Expresión de membrana. 200x y 400x

Tabla 32. Diferencias en expresión de CD24 por subtipos de CCE ($p = ns$)

Subtipo histológico	Expresión elevada (n y %)
CCE queratinizante	6 / 33 (18%)
CCE no queratinizante	5/14 (36%)

6.2.4 *ALDH1*: En el parénquima pulmonar no tumoral, observamos tinción de *ALDH1* con intensidad variable en el epitelio bronquial (**Figura 33**).

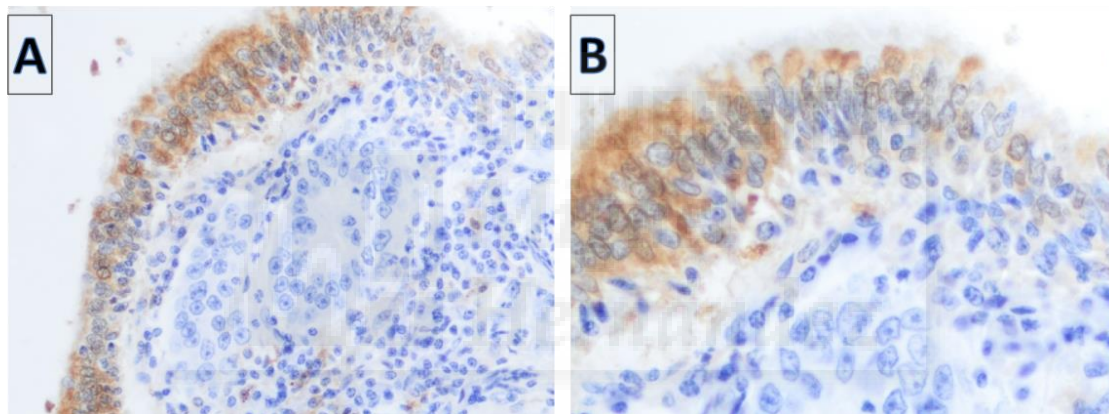


Figura 33. Expresión de *ALDH1* en parénquima pulmonar no tumoral. Positividad del epitelio bronquial (A) 100x (B) 200x

En áreas tumorales, del total de casos en que fue posible valorar *ALDH1* ($n=138$), 64% de los casos (88/138) fueron positivos (punto de corte $\geq 5\%$), sin diferencias significativas entre edad, sexo, tabaquismo, tamaño tumoral y estadio (**Tabla 33**).

Tabla 33. Expresión de ALDH1 en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas

Variables clínico-patológicas	ALDH1 ≥5 (n y %)	p
<i>Edad</i>		
< 60	20/30 (67%)	ns
≥ 60	68/108 (63%)	
<i>Sexo</i>		
Hombre	69/110 (63%)	ns
Mujer	19/28 (68%)	
<i>Fumador</i>		
Si	79/122 (65%)	ns
No	8/14 (57%)	
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	41/64 (64%)	ns
≥ 30 mm	47/74 (64%)	
<i>Estadio</i>		
IA	41/64 (64%)	ns
IB	24/44 (55%)	
II	23/30 (77%)	

a. Variables proliferativas y expresión de ALDH1: La expresión de ALDH1 demostró ser significativamente superior en casos con incremento en la actividad proliferativa (valorada tanto por HE, número de mitosis, como por IHQ, expresión de Ki67). No hubo diferencias en relación con la expresión de p53 (**Tabla 34**).

Tabla 34. Expresión de ALDH1 y correlación con variables proliferativas y expresión de p53

VARIABLES PROLIFERATIVAS Y EXPRESIÓN DE p53	ALDH1 ≥5 (n y %)	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	33/62 (53%)	0,02*
≥ 10	55/66 (72%)	
<i>Ki67</i>		
< 30%	28/55 (51%)	0,001*
≥ 30%	52/66 (79%)	
<i>p53</i>		
< 30	36/60 (60%)	ns
≥ 30	45/66 (68%)	

b. Expresión de ALDH1 por tipos histológicos: los CCG mostraron mayor expresión de ALDH1 (positiva en 7/9 casos, 79%), seguidos por los CCE en 77% (36/47 casos), siendo los ACA en los que se observó menos expresión de ALDH1 (55%, 45/82 casos) (**Figura 34**).

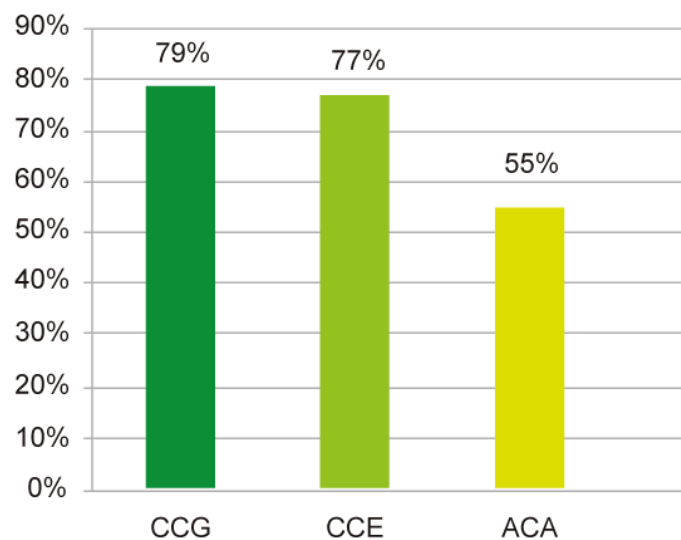


Figura 34. Expresión de ALDH1 según tipos histológicos (p= 0,03)

En el grupo de CCE, ALDH1 se expresó de manera predominante en los tumores queratinizantes ($p = 0,05$) (**Tabla 35**), sin que se identificaran diferencias en expresión en relación con el resto de variables clínico-patológicas (edad, sexo, tabaquismo, tamaño tumoral o estadio) (**Figura 35**).

Tabla 35. Diferencias en expresión de ALDH1 por subtipos de CCE ($p = 0,05$)

Subtipo histológico	Expresión elevada (n y %)
CCE queratinizante	28 / 33 (85%)
CCE no queratinizante	8/14 (57%)

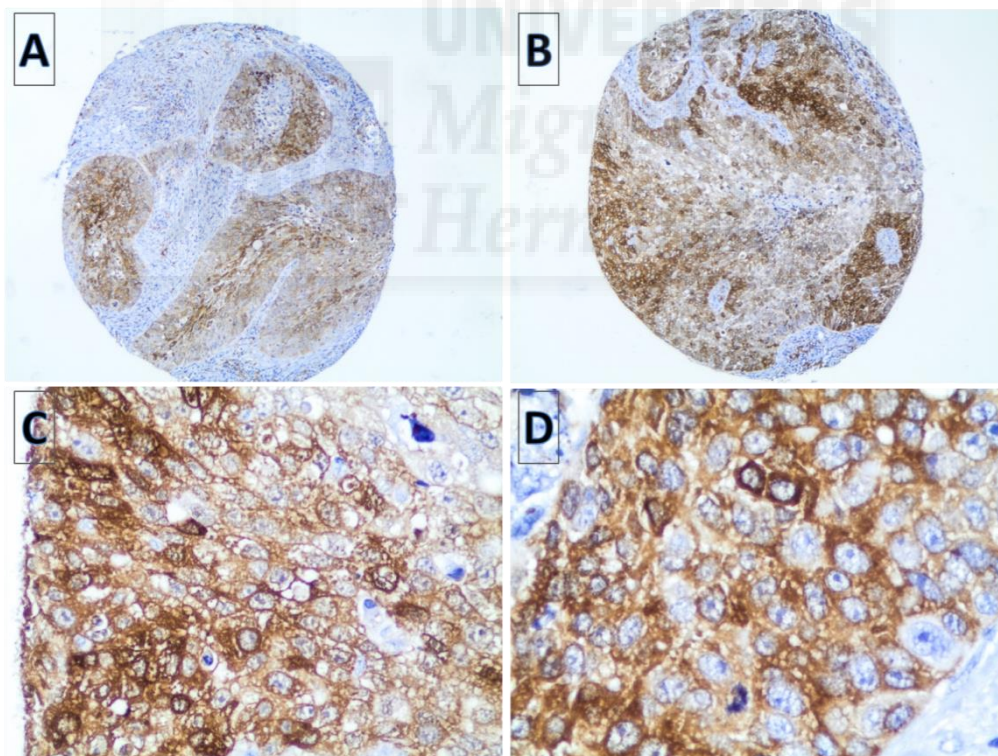


Figura 35. Expresión de ALDH1 en CCE. Expresión citoplasmática (A) y (B) TMA 40x. (C) y (D) 400x

En los ACA, la expresión de ALDH1 (**Figura 36**) no mostró asociación con las diversas variables clínico-patológicas ni con los subtipos morfológicos ($p= ns$). El análisis por subgrupos en ACA mal diferenciados (patrón sólido) tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 36**).

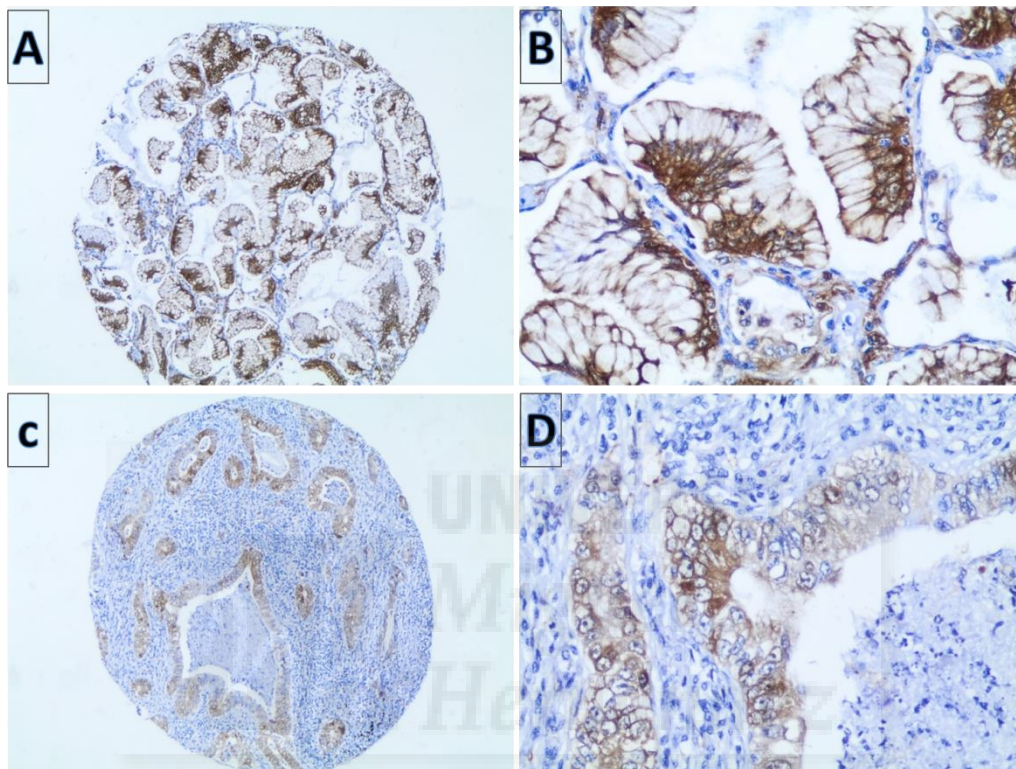


Figura 36. Expresión de ALDH1 en ACA. Expresión citoplasmática (A) TMA, 40x (B) 400x. (C) ACA de patrón acinar, TMA 40x y (D) 400x

Tabla 36. Expresión de ALDH1 en ACA según grado de diferenciación (patrón sólido *versus* otros) ($p=ns$)

Expresión de ALDH1	ALDH1 elevada ($\geq 5\%$)
ACA sólido	12 / 24 (50%)
ACA no sólido	33/58 (57%)

6.2.5 Sox2: El análisis de la expresión de SOX2 en parénquima pulmonar no tumoral mostró expresión en el epitelio bronquial, con negatividad en la celularidad alveolar. En los casos tumorales, del total (n= 120) incluyendo los diferentes tipos histológicos, 64% (77 casos) fueron negativos y 36% (43 casos) positivos (punto de corte $\geq 10\%$) (**Figura 37**).

Se observó una diferencia significativa estadísticamente en cuanto a expresión por sexos (positividad en 40/95 hombres -42%- en comparación con 3/25 mujeres - 12%- $p= 0,005$). En relación con antecedente de tabaquismo, la expresión de Sox2 fue valorada en 128 pacientes; los fumadores mostraron mayor frecuencia de expresión (positivo en 42/105 (40%) casos *versus* 1/13 (8%) en no fumadores, $p= 0,03$). No hubo diferencias en cuanto a expresión en relación con la edad, tamaño tumoral o estadio tumoral (**Tabla 37**).

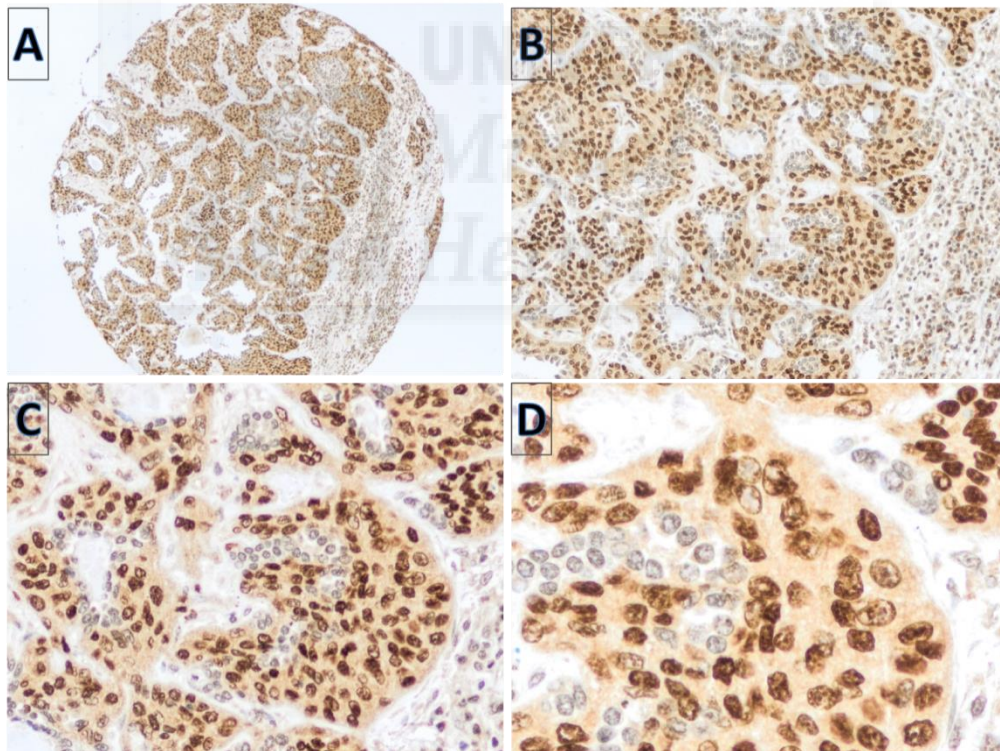


Figura 37. Expresión nuclear de Sox2 en CCE (A) TMA, 40x. (B) 100x (C) 200x (D) 400x. Nótese la ausencia de expresión en neumocitos (C y D).

Tabla 37. Expresión de Sox2 en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas

VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Sox2 ≥10%	p
<i>Edad</i>		
< 60	6/27 (22%)	0,09
≥ 60	37/91 (40%)	
<i>Sexo</i>		
Hombre	40/95 (42%)	0,005*
Mujer	3/25 (12%)	
<i>Fumador</i>		
Si	42/105 (40%)	0,030*
No	1/13(8%)	
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	19/57 (33%)	ns
≥ 30 mm	24/63 (38%)	
<i>Estadio</i>		
IA	14/57 (33%)	ns
IB	14/39 (36%)	
II	10/24 (42%)	

a. Variables proliferativas y expresión de Sox2: Sox2 fue positivo con mayor frecuencia en tumores con elevado índice de proliferación (Ki67) (35/61 casos con Ki67 elevado -57%- fueron positivos, versus 8/53 casos -15%- con Ki67 bajo ($p=0,000$) y con mayor número de mitosis ($p=0,000$). También se observó una fuerte asociación entre positividad para SOX2 y expresión aumentada de p53 ($p=0,0000$) (Tabla 38).

Tabla 38. Expresión de Sox2 y correlación con variables proliferativas y expresión de p53

Variables proliferativas y expresión de p53	SOX2 ≥ 10%	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	9/55 (16%)	0,000
≥ 10	34/65 (75%)	
<i>Ki67</i>		
< 30%	8/53 (15%)	0,000
≥ 30%	35/61 (57%)	
<i>P53</i>		
< 30%	10/58 (17%)	0,000
≥ 30%	33/62 (53%)	

b. Expresión de Sox2 por tipos histológicos: En cuanto a diferencias según tipos histológicos (**Figura 38**), se observó predominancia de expresión en CCE (33/37 casos), seguidos por CCG (4/9 casos). Sólo 6/74 casos de ACA tuvieron expresión elevada de Sox2.

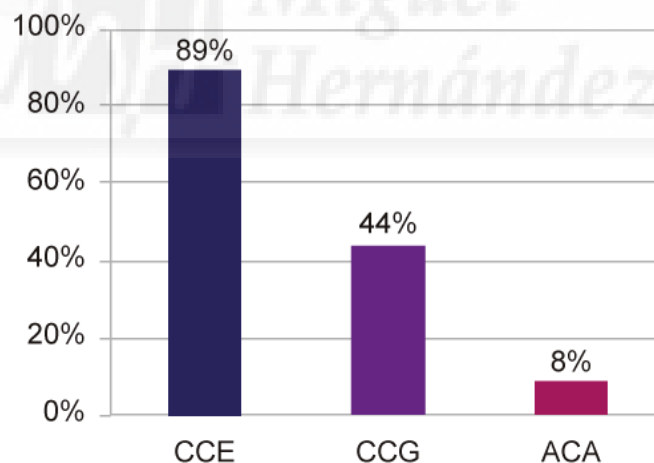


Figura 38. Expresión elevada de Sox2 por tipos histológicos (p= 0,000)

En el grupo de CCE, la expresión de Sox2 (**Figura 39**) no mostró diferencias entre tumores queratinizantes *versus* no queratinizantes (p = 0,2) (**Tabla 39**), así como tampoco hubo diferencias en expresión en relación con edad, sexo, tabaquismo, tamaño y estadio. Sí que se observó asociación entre positividad para Sox2 y actividad proliferativa alta con Ki67 (p=0,026) y expresión de p53 (p=0,038).

Tabla 39. Diferencias en expresión de Sox2 por subtipos de CCE ($p = 0,05$)

Subtipo histológico	Expresión elevada (n y %)
CCE queratinizante	26 / 28 (96%)
CCE no queratinizante	7/9 (78%)

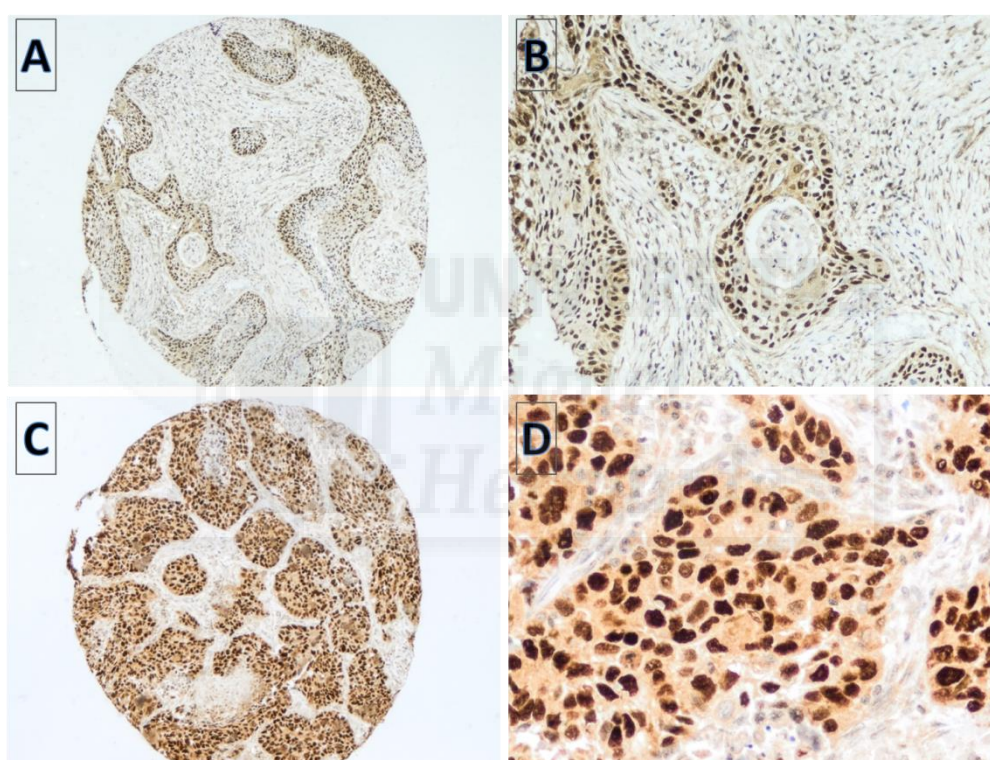


Figura 39. Expresión nuclear de Sox2 en CCE. Ambos casos (panel superior e inferior), corresponden a CCE bien diferenciados. (A) TMA, 40x. (B) 200x (C) TMA, 40x (D) 400x

En los ACA, la expresión de Sox2 no mostró asociación con las diversas variables clínico-patológicas ni con los subtipos morfológicos ($p = ns$). El análisis por subgrupos en ACA mal diferenciados (patrón sólido), tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = ns$) (Tabla 40) (Figura 40).

Tabla 40. Expresión de Sox2 en ACA según subtipo histológico

Subtipo histológico	SOX2 ≥ 10
ACA sólido	3 / 22 (14%)
ACA no sólido	3/52 (6%)

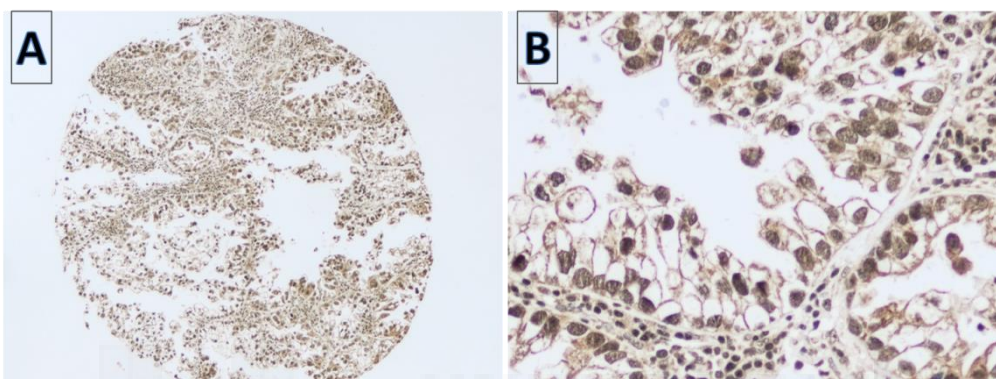


Figura 40. Expresión de Sox2 en ACA. (A) TMA, 40x. (B) 400x

6.2.6 *CD133*: El análisis de la expresión de *CD133* en parénquima pulmonar no tumoral mostró expresión de *CD133* en epitelio bronquial, así como en macrófagos intraluminales (**Figura 41**).

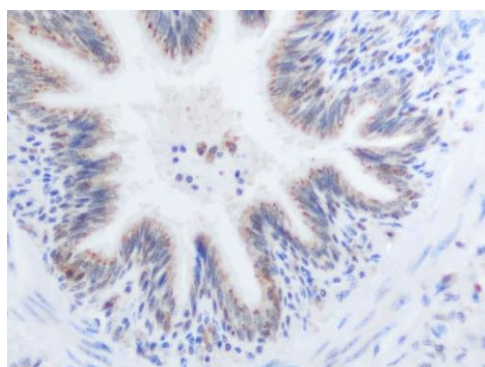


Figura 41. Expresión de *CD133* en epitelio bronquial y macrófagos intraluminales (100x)

Del total de casos en que fue posible valorar *CD133* (n= 138), 85 (61,6%) fueron negativos y 53 (38,4%) positivos (punto de corte $\geq 10\%$). Se observó una diferencia significativa estadísticamente en cuanto a expresión de *CD133* por sexos

(positividad en 16/27 mujeres – 59%- en comparación con 11/37 hombres -33%- con $p= 0,013$).

En relación con antecedente de tabaquismo, los pacientes no fumadores presentaron mayor porcentaje de positividad para CD133 (77% versus 34% en fumadores) ($p= 0,003$). No hubo diferencias en cuanto a expresión en relación con la edad, tamaño tumoral o estadio tumoral (**Tabla 41**).

Tabla 41. Expresión de CD133 y correlación con variables clínicas. * Tendencia a la significación. ** Diferencia estadísticamente significativa

Variables clínico-patológicas	CD133 ≥ 10 (n y %)	p
<i>Edad</i>		
< 60	8/30 (26,7)	
≥ 60	45/108 (41,7)	0,084*
<i>Sexo</i>		
Hombre	11/37 (33,3)	
Mujer	16/27 (59,3)	0,013**
<i>Fumador</i>		
Si	42/123 (34,1)	
No	10/13 (76,9)	0,003**
<i>Tamaño</i>		
< 30 mm	23/53 (43,4)	
≥ 30 mm	30/85 (35,3)	ns
<i>Estadio</i>		
IA	26/65 (40,0)	
IB	15/44 (34,1)	
II	12/29 (41,4)	ns

a. Variables proliferativas y expresión de CD133: La expresión de CD133 demostró ser significativamente superior en casos con menor actividad proliferativa (valorada tanto por HE, número de mitosis, como por IHQ, expresión de Ki67). CD133 fue más frecuentemente positivo en casos negativos para p53 (**Tabla 42**).

Tabla 42. Expresión de CD133 y relación con variables proliferativas y p53. **

Variables proliferativas y p53	CD133 ≥10 (n y %)	p
<i>Mitosis x 10cga</i>		
< 10	33/63 (52,4)	
≥ 10	20/75 (26,7)	0,002**
<i>Ki67</i>		
< 30%	32/56 (57,1)	
≥ 30%	13/65 (20,0)	0,000**
<i>P53</i>		
< 30	29/59 (49,2)	
≥ 30	19/65 (29,2)	0,023**

b. Expresión de CD133 por tipos histológicos: Mientras que algo más de la mitad de ACA fueron positivos (46/83) para CD133, sólo una minoría de CCE expresaron positividad para este marcador (5/46). De los 9 CCG, sólo 2 expresaron CD133 (Figura 42).

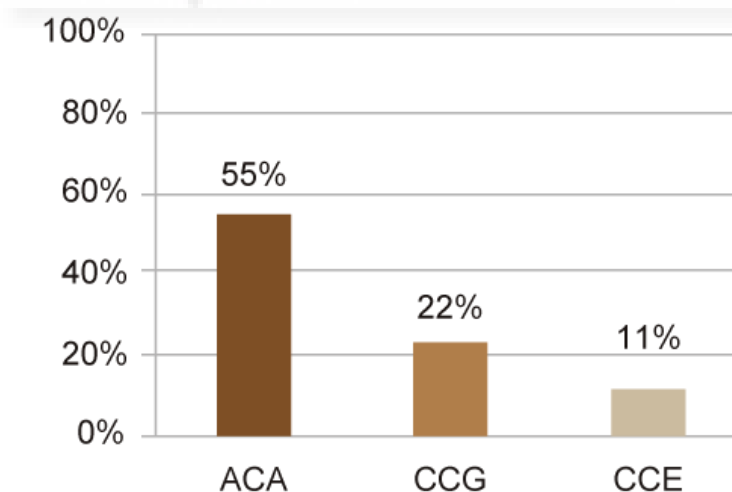


Figura 42. Expresión de CD133 por tipos histológicos (p= 0,000)

En los ACA positivos para CD133 el patrón de tinción observado fue citoplasmático difuso, más intenso que en el epitelio bronquial (Figura 43).

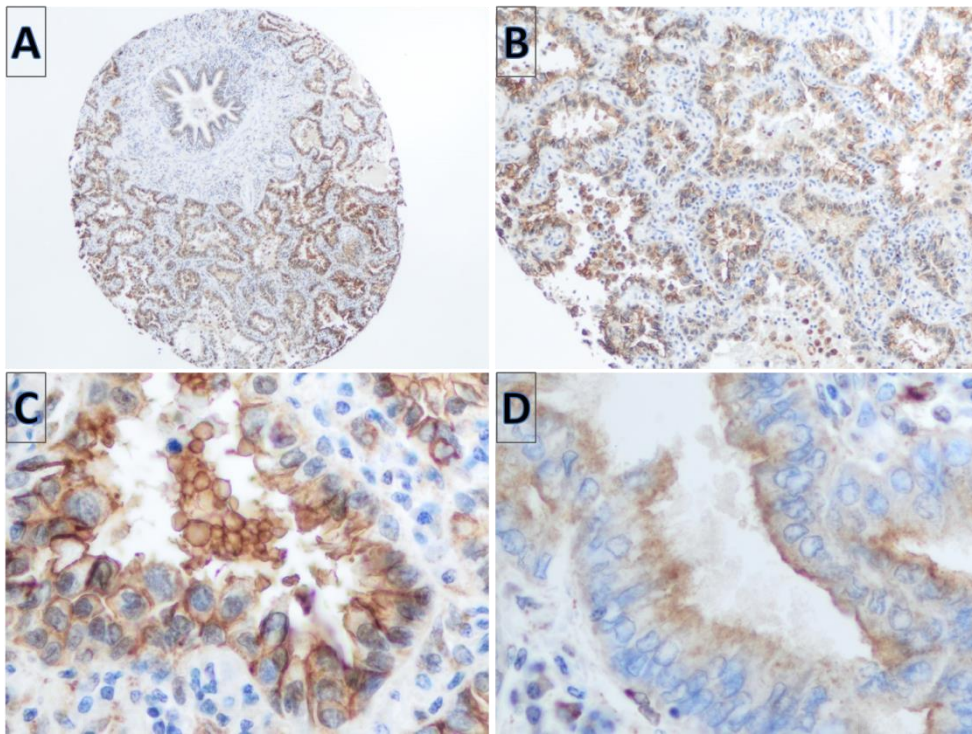


Figura 43. Patrón de expresión de CD133 en ACA (A) TMA, 40x (B) ACA de tipo acinar 200x (C) Tinción citoplasmática con refuerzo de membrana. Macrófagos luminales positivos, 400x (D) Patrón de tipo luminal, 400x

En los pocos CCE positivos para CD133 (5/46 casos), la expresión fue más intensa, de patrón citoplasmático con refuerzo de membrana (**Figura 44**).

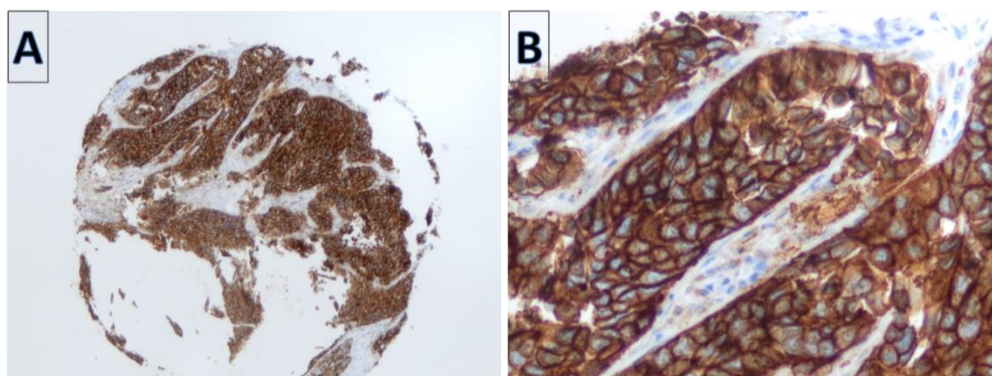


Figura 44. Expresión de CD133 en CCE, patrón citoplasmático. (A) TMA, 40x. (B) 200x

6.3 Análisis de correlación entre variables

Para entender mejor las posibles relaciones entre los marcadores de células madre estudiados se realizó un análisis de correlación de Spearman (test no paramétrico) (Tabla 43).

Tabla 43. Resultados del análisis de correlación de Spearman

Marcadores	R de Spearman	p
CD44v – CD44	0,62	0,000
CD24 – CD44	-0,34	0,000
CD24 – CD44v	-0,22	0,01
ALDH1 – CD44	0,015	ns
ALDH1 – CD44v	0,10	ns
ALDH1 – CD24	-0,87	ns
SOX2 – ALDH1	0,34	0,000
SOX2 – CD24	-0,38	0,000
SOX2 – CD44	0,61	0,000
SOX2 – CD44v	0,57	0,000
ALDH1 – CD133	-0,049	ns
CD133 – CD44	-0,321	0,000
CD133 – CD44v	-0,240	0,005
CD133 – SOX2	-0,419	0,000

CD44 y CD44v muestran una relación directa, concordante con lo esperado al ser isoformas de la misma proteína; CD24 y CD44 muestran una relación lineal inversa, al igual que CD24 / CD44v. Sox2 mostró una relación lineal con ALDH1 e inversa con CD24.

En referencia a la expresión de los diversos marcadores de células madre y variables proliferativas, se observó una relación directa entre positividad para CD44, CD44v, ALDH y Sox2 con la expresión elevada de Ki67 y p53 (Tabla 44).

Tabla 44. Correlación entre marcadores de células madre y variables proliferativas

Marcadores	R de Spearman	p
CD44 – Ki67	0,290	0,001
CD44v – Ki67	0,301	0,001
CD24 – Ki67	-0,274	0,002
ALDH1 – Ki67	0,220	0,014
SOX2– Ki67	0,407	0,000
CD133 – Ki67	-0,356	0,000
CD24 – p53	-0,102	0,26
CD44 – p53	0,272	0,003
CD44v – p53	0,203	0,027
ALDH1 – p53	0,114	0,21
SOX2– p53	0,384	0,000
CD133 – p53	-0,151	0,099

6.4 Análisis de supervivencia

Se realizó análisis de supervivencia univariado, no paramétrico, mediante el método de Kaplan Meier para cada uno de los marcadores IHQ. Para comparar la distribución de los resultados se usó la prueba del logaritmo del rango (log rank). No se realizó análisis en el grupo de carcinomas de célula grande debido al escaso número de casos (9 pacientes).

6.4.1 CD44: La expresión de CD44 no demostró relación con la supervivencia global (SG) ($p= ns$) ni con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ($p= ns$) en el conjunto de tumores (todos los grupos histológicos). Al estratificar por tipos histológicos tampoco se encontraron diferencias; en ACA, la diferencia en SG no fue significativa, así como tampoco la SLE ($p= ns$). La SLE en el grupo de CCE no fue valorable debido al escaso número de casos de CCE negativos para CD44.

6.4.2 *CD44v*: En el análisis global, considerando todos los tipos histológicos, la expresión de *CD44v* no demostró relación con la supervivencia global (SG) ($p=0,78$) ni con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ($p=0,82$).

El análisis por subgrupos mostró en los ACA una tendencia a peor SLE en relación con positividad para *CD44v* (91 meses *versus* 108 meses en los casos de baja expresión) ($p=ns$) (**Figura 45**). No se observaron diferencias en cuanto a SG. En los CCE y CCG no se identificó ninguna relación.

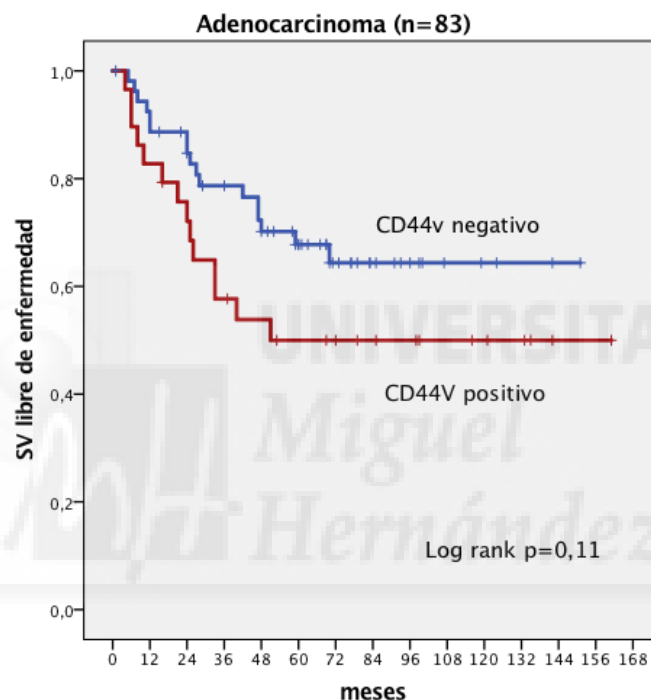


Figura 45. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de *CD44v* en ACA. Seguimiento en meses. (HR 1,748; IC 95% 0,861-3,549 $p=0,11$)

6.4.3 *CD24*: considerando todos los tipos histológicos, la expresión de *CD24* no demostró relación con SG ($p=0,38$). En cuanto a la SLE, los casos positivos tuvieron tendencia a mayor supervivencia ($p=0,15$) (**Figura 46**).

El análisis por subgrupos mostró en ACA una relación directa entre positividad para *CD24* y mayor SLE (120 meses *versus* 78 meses en los casos negativos) ($p=0,021$) (**Figura 47**). No se observaron diferencias en SG. En CCE y CCG no se identificaron diferencias en la SLE ni SG.

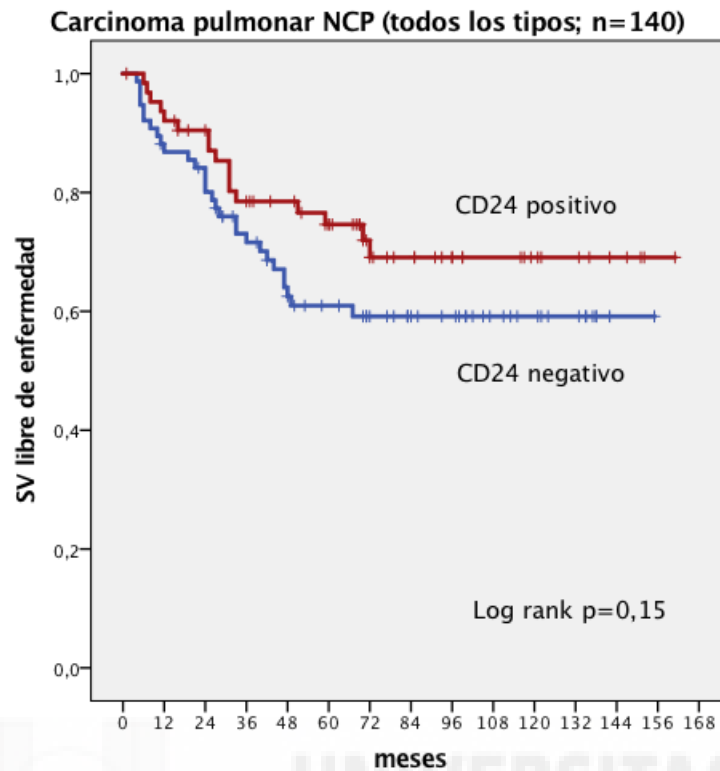


Figura 46. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia según expresión de CD24 en todos los tipos histológicos (HR 0,65; IC 95% 0,357-1,184; $p=0,15$).

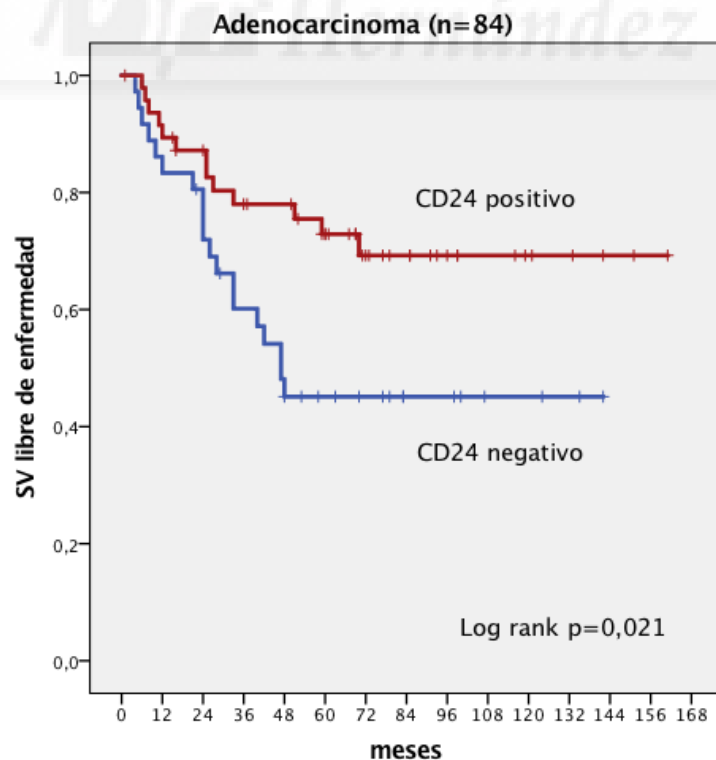


Figura 47. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de CD24 en ACA. Seguimiento en meses. (HR 0,447; IC 95% 0,221-0,908; $p=0,022$).

6.4.4 ALDH1: Análisis de supervivencia realizado en 138 casos. Considerando todos los tipos histológicos, la positividad para ALDH1 se relacionó con una tendencia a mayor SG (104 meses *versus* casos negativos, 91 meses. HR 0,673; IC 95% 0,411-1,102; $p=0,11$). La diferencia fue significativa en cuanto a SLE; los casos de tumores positivos para ALDH1 tuvieron mejor pronóstico (SLE=117 meses) que los negativos (SLE= 97 meses) (HR 0,550; IC 95% 0,313-0,995; $p=0,044$) (**Figura 48**).

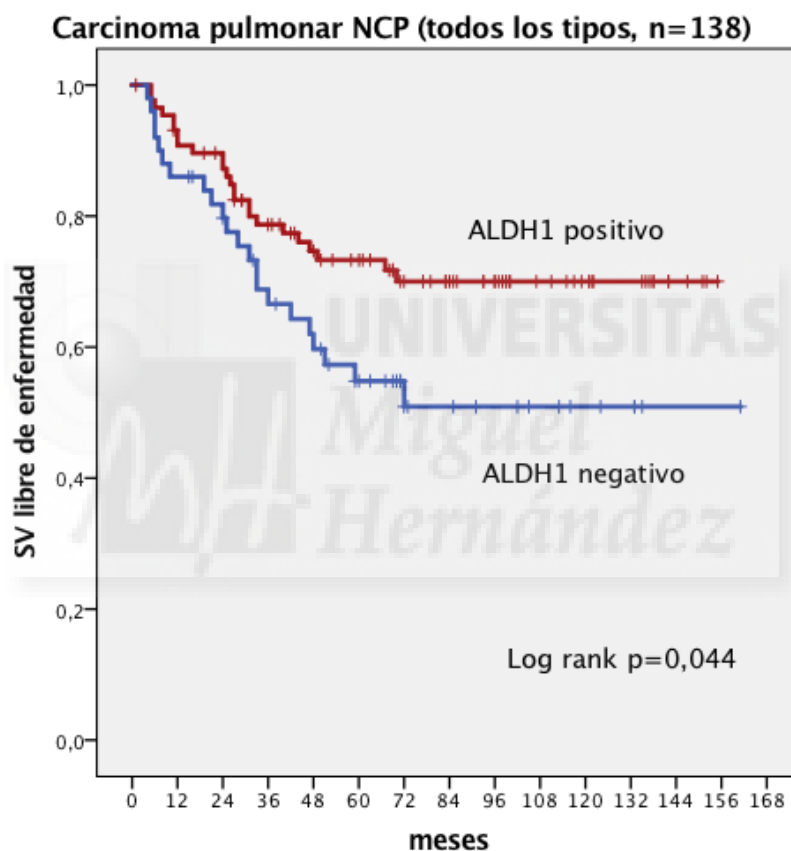


Figura 48. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de ALDH1 en todos los grupos histológicos (HR 0,550; IC 95% 0,313-0,995; $p=0,044$).

Al separar por tipos histológicos, los ACA (n= 82) no mostraron diferencias significativas en cuanto a expresión de ALDH1 y supervivencia global (100 meses en casos positivos para ALDH1 *versus* 90 meses en casos negativos; $p= ns$). La SLE tampoco mostró diferencias significativas en este grupo (106 meses para ACA positivos *versus* 95 meses para los negativos para ALDH1; $p= ns$).

En el grupo de CCE (n= 47), la tendencia fue a mayor SG en los casos con mayor expresión de ALDH1 (106 meses *versus* 77 meses. HR 0,554; IC 95% 0,226-1,359; p= 0,19). La SLE fue de 129 meses en los casos positivos *versus* 92 meses en los negativos (p= 0,21).

6.4.5 Sox2: Análisis de supervivencia realizado en 120 casos. No se observaron diferencias en SG en los casos positivos respecto a los negativos (p= 0,9). En cuanto a la SLE, los casos positivos para SOX2 mostraron una tendencia hacia mayor SLE (122 meses *versus* 103 meses en casos negativos. HR 1,88; IC 95% 0,921-3,834; p= 0,077) (**Figura 49**). El análisis de supervivencia por tipos histológicos no mostró diferencias significativas.

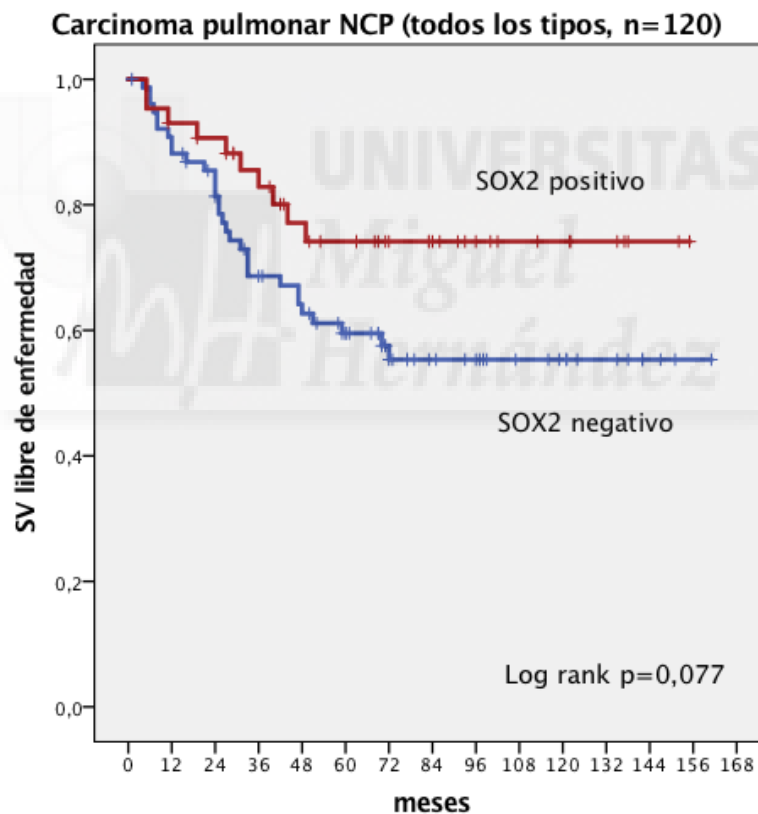


Figura 49. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de SOX2 en todos los grupos histológicos (HR 1,88; IC 95% 0,921-3,834; p= 0,077).

6.4.6 CD133: Análisis de supervivencia realizado en 138 casos. No se observó una diferencia significativa en SG en los casos positivos respecto a los negativos. En cuanto a SLE, la positividad para CD133 se relacionó con una tendencia a peor

comportamiento (117 meses en casos negativos *versus* 100 meses en casos positivos, $p=0,07$). El análisis de supervivencia por tipos histológicos no mostró diferencias significativas.

6.4.7 Análisis de Supervivencia y relación CD44 / CD24: Se exploró la relación entre CD44v / CD24 en el grupo de ACA debido a:

- Resultados del análisis univariado que señalan a CD24 como variable asociada a mejor SLE en ACA ($p= 0,021$) y a CD44v como variable con tendencia a peor pronóstico en este mismo grupo histológico ($p= 0,11$).
- Correlación inversa observada entre CD44v y CD24 ($p= 0,01$).
- Publicaciones previas en la literatura que señalan una posible asociación entre estos marcadores (91, 92).

El grupo total de ACA ($n= 83$ casos) fue categorizado en grupos, según las diferentes combinaciones de resultados de expresión CD44v/CD24. Debido a que la SLE había demostrado previamente asociación con la expresión de CD24 y tendencia a la asociación con expresión de CD44v, se seleccionó como medida de resultado para el análisis de supervivencia (**Tabla 45**):

Tabla 45. ACA ($n=83$) agrupados según expresión de CD44v y CD24 y SLE ($p= 0,017$)

Grupo	CD44v	CD24	Grupo pronóstico	n	SLE (meses)
1	Negativo	Positivo	Negativo / Positivo"	32	115
2	Negativo	Negativo	"Negativo / Negativo"	22	93
3	Positivo	Positivo	"Positivo / Positivo"	16	116
4	Positivo	Negativo	"Positivo / Negativo"	13	55

Se concluye que el grupo 1 (CD44v^{NEG} / CD24^{POS}) y el grupo 3 (CD44v^{POS} / CD24^{POS}), muestran SLE cercanas (115 y 116 meses, respectivamente) y por lo tanto es posible agruparlos para el análisis (48 casos con SLE de 120 meses). Este grupo lo denominamos “*Pronóstico favorable*” (color blanco en la tabla 45). El grupo 2 fue denominado como “*Pronóstico intermedio*” (color amarillo en tabla 45) y el 4 como “*Pronóstico desfavorable*” (color rojo en tabla 45) (Tabla 46 y Figura 50).

Tabla 46. Grupos de riesgo combinando CD44v y CD24 (p =0,007).

Grupo	N	SLE (meses)
Favorable	48	120
Intermedio	22	93
Desfavorable	13	55

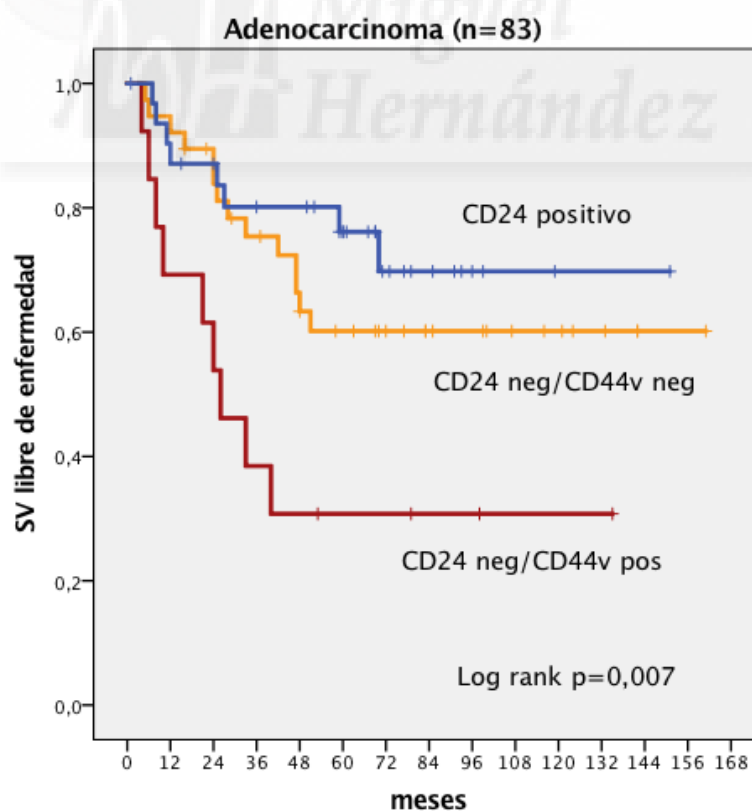


Figura 50. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en ACA: CD24+ versus CD24-/CD44v- versus CD24-/CD44v+. Seguimiento en meses.

Estratificando en dos grupos (desfavorable *versus* favorable e intermedio) se observaron diferencias también significativas, con una SLE en el grupo desfavorable de 55 meses (IC 95% 25-84) *versus* 115 meses (IC 95% 99-131) en el grupo de riesgo favorable / intermedio ($p=0,002$) (HR 3,145; IC 95% 1,442-6,858; $p=0,002$) (Figura 51).

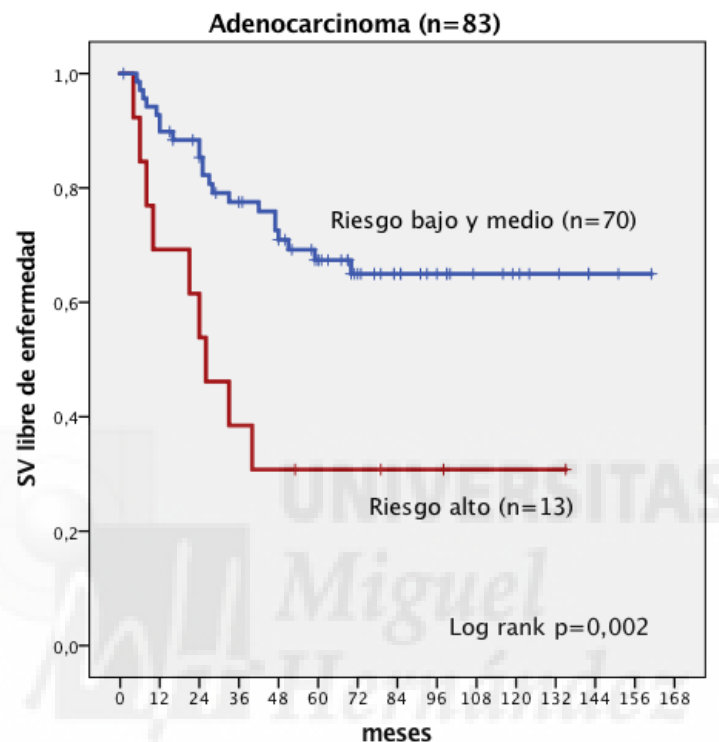


Figura 51. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en ACA: grupo de riesgo bajo y medio *versus* grupo desfavorable. Seguimiento en meses.

No hubo diferencias significativas en la distribución del perfil pronóstico desfavorable (CD44^{POS} / CD24^{NEG}) en relación con el grado de diferenciación de ACA (bien diferenciados *versus* mal diferenciados) ($p= 0,36$).

6.4.8 Análisis de Supervivencia y relación con otras variables: El estudio de supervivencia libre de enfermedad y global con otras variables clínicas y patológicas (tabaquismo, edad, sexo, tamaño tumoral, tabaquismo, tipo histológico, grado, proliferación celular) no mostró diferencias significativas, por lo que no fue posible realizar un análisis multivariado con los resultados.





7. DISCUSIÓN

El estudio de biomarcadores en CPCNP en la última década se ha centrado en la identificación de moléculas con capacidad pronóstica y predictiva que permitan estratificar mejor los pacientes y sirvan como guía en las decisiones terapéuticas, concepto al que hace referencia la medicina de precisión (108). Es así como la identificación de marcadores de células madre ha constituido un importante foco de atención en investigación oncológica reciente (64, 72).

Si la hipótesis de las CMCs demuestra ser correcta, la valoración de la expresión de marcadores de células madre en tumores en estadios tempranos podría predecir el riesgo de recurrencia tras tratamiento quirúrgico.

El uso de técnicas IHQ está totalmente incorporado en la práctica rutinaria en los servicios de Anatomía Patológica, y la posibilidad de valorar marcadores de células madre mediante IHQ es una fortaleza adicional que añade valor a los estudios en este campo.

Estudiamos una serie de 140 casos de CPCNP, con seguimiento medio de 69 meses; nuestra cohorte mostró características demográficas superponibles a las reportadas en España en casos similares: pacientes mayoritariamente fumadores, en la séptima década de la vida y predominio de sexo masculino (ratio hombre : mujer de 4).

La homogeneidad de los casos incluidos (estadios iniciales, ausencia de compromiso ganglionar y de neoadyuvancia), así como el amplio seguimiento, constituyen algunas de las fortalezas de nuestra serie.

La distribución por tipos histológicos se ajusta a los porcentajes descritos en la literatura, con predominio de ACA. El porcentaje de casos clasificados como CPCNP "NOS", basados en H&E, fue de 18%; tras el uso de técnicas de IHQ, la cifra se redujo a 6,4%.

7.1 Expresión de CD44 y CD44v

Inicialmente descrita como proteína con funciones de receptor de hialuronato, CD44 ha demostrado poseer características de *stem cell* en neoplasias pulmonares (77). El estudio de las isoformas de CD44 se ha centrado en dos variantes: CD44s (forma estándar) y CD44v, que participan en procesos de migración celular, adhesión de linfocitos al endotelio ("*homing*") y tumorigénesis (84).

Se propone que CD44v6 es la principal isoforma involucrada en la invasión, progresión y metástasis tumoral (78); mediante la activación de la vía de PI3K/Akt y MAPK, CD44v participa en procesos de regulación de la matriz extracelular, promueve la movilidad de la célula e inhibe apoptosis.

La expresión de CD44 y CD44v que observamos en parénquima pulmonar no tumoral es concordante con la reportada por otros (70, 75). Identificamos expresión de membrana, tanto de CD44 como de su isoforma CD44v, en células basales bronquiales y en menor grado en neumocitos.

La distribución de expresión de CD44 y CD44v observada en nuestra serie es similar a la reportada en la literatura (43% del total de casos positivos para CD44 y 54% para CD44v) sin relación con variables como género, edad, tamaño tumoral o estadio (70).

7.1.1 Expresión de CD44 e isoformas y distribución por tipos histológicos: La literatura reporta mayor expresión de CD44 y sus isoformas en tumores de histología escamosa (70, 75, 109), datos concordantes con nuestros hallazgos (92% y 93% de CCE con positividad alta para CD44 y CD44v6, respectivamente, $p=0,000$, resultados presentados por nuestro grupo con anterioridad, a manera de póster, Congreso Anual de la USCAP 2014, San Diego).

En el caso de ACA la situación es diferente, siendo menor el porcentaje de casos positivos tanto para CD44 como para CD44v (19% y 35% respectivamente en nuestra serie, datos concordantes con la literatura) (70).

Debido a que los neumocitos tipo II expresan CD44v6, cabría esperar que el subgrupo de adenocarcinomas con patrón predominantemente lepidico tuviesen mayor expresión. Sin embargo, los estudios no han confirmado este supuesto (70) y tampoco lo observamos en nuestra cohorte.

7.1.2 Expresión de CD44 e isoformas y relación con supervivencia: En el caso de CD44, no identificamos ninguna relación entre su expresión y SG o SLE. Al respecto, estudios anteriores no son concluyentes con los resultados y mientras que algunos trabajos establecen que su elevación condiciona un peor pronóstico (74), otros concluyen que es un marcador asociado a mayor supervivencia (84). Sin embargo, la heterogeneidad de los estudios limita las conclusiones (**Tabla 47**).

Tabla 47. Estudios incluidos en meta-análisis de CD44, realizados en tejido incluido en parafina con valoración mediante IHQ (84).

Autor	n	Estadio	Tipo histológico	Ac	Método	Corte	Asociaciones
Clarke	29	I-II	ACA	3G12	Score	>2	Menor SV
Leung	123	NE	ACA 96 CCE 27	Clon 156-3C11	Intensidad (cultivos celulares)	NE	ACA: mayor SV CCE:NS
Sterlacci	123	I-IV	CCE	Ventana	Mediana	Mediana	Mayor SV

CPCNP: Cáncer de pulmón de célula no pequeña. NE: No Especificado. NS: no significativo. %: Porcentaje. I: Intensidad. CD44s: isoforma estándar

Los estudios con isoformas de CD44 tampoco son concluyentes (**Tabla 48**). Una cohorte estudiada en 2010, de 190 pacientes con CPCNP estadio I, con tratamiento quirúrgico con intención curativa y sin tratamiento adyuvante, no encontró ninguna relación entre expresión de CD44v6 y supervivencia en el grupo global de CPCNP (70), de manera similar a nuestros hallazgos, que no identificaron relación entre expresión de CD44v y SG o SLE.

Tabla 48. Estudios incluidos en dos meta-análisis de isoformas de CD44 y relación con supervivencia. Todos los estudios incluidos contaban con valoración mediante IHQ (modificado de 78, 84). ND: No Disponible. Neoady: Neoadyuvancia.

Ref	n	Estadio	Tipo histológico	Método	Corte	Asociación
Hirata, 98 CD44v6	69	I	ACA 43 CCE 25 Otros 1	% de cél positivas	>20%	Menor SV
Fukuse, 99 CD44v6	34	ND	ACA: 21 CCE: 12 Otros: 1	% de cél positivas	>20%	Mayor SV/NS
Takanami-00 CD44s	164	I-III A	ACA	% de cél positivas	>1%	Menor SV/NS
Nguyen, 00 CD44v6	106	ND	ACA: 51 CCE: 33 Otros: 22	Núm cél positivas	>200 cél	Menor SV
Ramasami, 00 CD44v6	120	I-III	ACA	% de cél positivas	>10%	Mayor SV/NS
Hua, 04 CD44v6	62	ND	ACA: 29 CCE: 33	% de cél positivas	>10%	Menor SV
Lin, 04 CD44v6	43	I-III	ACA: 19 CCE: 24	% de cél positivas	>10%	Menor SV
Ping, 05 CD44v6	52	I-IV	ACA: 21 CCE: 31	% de cél positivas	>10%	Menor SV
Situ, 10 CD44v6	190	I	ACA: 60 CCE: 71 Otros: 59	Score %*1 %: 0, 1 (1- 10%), 2 (11-25%), 3 (26- 50%), 4 (51-75%), 5 >75%) I: 0-3	Score Bajo (0-12). Alto (13-15)	Mayor SV/NS
Ko-11 CD44s	159	I-III	ACA 82 CCE 77	Score %*1 %: 0, 1 (1- 10), 2 (11- 50), 3 (>50) I: 0-3	Score Bajo (0-3). Alto (4-9)	Expresión predominante en CCE ACA: Menor SV. Met GL, grado CCE: NS
Sun, 13 CD44v6	159	I-III	ACA: 55 CCE: 102 Otros: 2	%:	Negativo: ≤20% Positivo: >20	Menor SV

Mayor SV/NS: estudios que asocian una alta expresión de CD44v6 con mayor supervivencia o bien con resultados no significativos.

Al separar por grupos histológicos, en los CCE los resultados son contradictorios. Algunas series señalan que el aumento de expresión de CD44v6 es un marcador independiente de mejor pronóstico ($p = 0,029$) (70), mientras que otros autores como Ko, 2011 (109), en su serie de 159 casos de CPCNP, estadios I-III sin neoadyuvancia previa, no observan ninguna relación. En nuestra serie no se identificó relación entre expresión de CD44v y SG o SLE en los CCE.

En el grupo de ACA, aunque algunos señalan una ausencia de relación (70), la información de un meta-análisis publicado en 2014 (78) restringido a CD44v6, señala que su sobreexpresión es un factor de mal pronóstico en pacientes con CPCNP. Los estudios incluían pacientes en estadios I a IV y casos con neoadyuvancia. Concluyen que la sobreexpresión de CD44v6 se relaciona con menor supervivencia y destacan que casos con baja expresión se suelen presentar con ausencia de metástasis ganglionares, generando interés de este marcador en relación con la estadificación.

En este mismo sentido, estudios previos (109) reportan elevación de CD44s en relación con metástasis ganglionares en ACA ($p=0,021$). Nuestros resultados son concordantes con este trabajo, observando en los ACA una tendencia a peor SLE en relación con expresión alta de CD44v (91 meses versus 108 meses en los casos de baja expresión, $p= 0,11$).

7.2 Expresión de CD24

Gracias a su anclaje de fosfatidil-inositol, CD24 se une a la superficie celular, actuando como molécula de adhesión y participando en procesos de interacción celular (110). Cumple un importante papel en la maduración de linfocitos, el desarrollo neuronal, la señalización intracelular y la regulación inmune (111). Se plantea que células CD24 positivas se unen de manera más efectiva a plaquetas y células endoteliales activas (110).

Trabajos previos describen elevación de CD24 en tumores de mama, vejiga, colon, páncreas y próstata; su sobreexpresión condiciona mayor agresividad y peor pronóstico (**Figura 52**). Recientemente se ha evidenciado cómo en carcinomas hepatocelulares, de colon y de páncreas, hay poblaciones de células iniciadoras tumorales CD24(+) con capacidad de auto-renovación, diferenciación y metástasis (112).

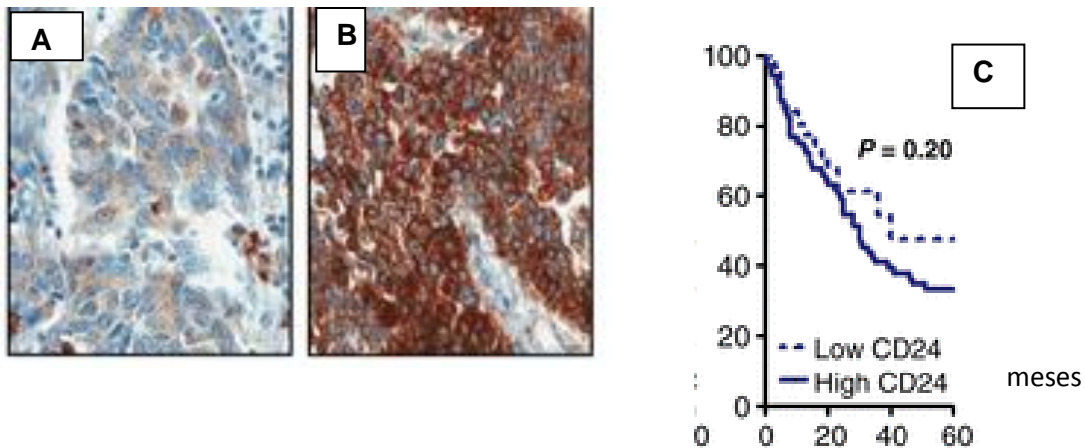


Figura 52. Expresión de CD24 (mediante IHQ) en carcinoma de vejiga: **(A)** 1+ Expresión débil. **(B)** 3+ Expresión difusa intensa. **(C)** Relación de expresión de CD24 y supervivencia (meses). Tomado de Thomas et al (112).

La expresión de CD24 en parénquima pulmonar no tumoral varía según los estudios; algunos autores como Kristiansen (113) señalan que CD24 muestra expresión de membrana en los neumocitos, mientras que el epitelio bronquial es negativo; estudios posteriores señalan expresión en la membrana apical del epitelio bronquial, así como patrón circunferencial de membrana en los neumocitos (86). En nuestra serie identificamos expresión luminal en los neumocitos y negatividad en el epitelio bronquial.

Las divergencias en cuanto a expresión de CD24 están condicionadas por diferencias intrínsecas a los anticuerpos disponibles. En algunos estudios (86, 113) emplean SN3b, anticuerpo monoclonal que se une a una estructura de glicanos presente en la superficie de CD24, y utilizado en el presente trabajo. Otros (110) utilizan SWA11, con diferente sitio de unión a la proteína; los resultados de la única serie publicada con este anticuerpo no muestran expresión de CD24 en la superficie alveolar en parénquima pulmonar sano, mientras que en el epitelio bronquial señalan expresión intensa en el borde apical.

En pulmón tumoral no hay disponibles estudios suficientes que permitan extrapolar los hallazgos anteriormente descritos para neoplasias en otros órganos.

La positividad global en CPCNP varía entre 34% (110) a 76% de casos (113); en nuestro estudio fue de 54%, sin diferencias notables según el anticuerpo empleado (**Tabla 49**).

Hay concordancia también en identificar mayor expresión citoplasmática / circunferencial de membrana de CD24 en pulmón neoplásico que en parénquima sano. Los casos positivos presentaban alguno de los 3 patrones de tinción (citoplasmática / membrana / luminal) sin que se observaran diferencias en relación con los patrones.

Tabla 49. Expresión de CD24 (citoplásmica y de membrana).

Referencia	Ac, clon y dilución	Casos positivos (global)	ACA positivos (expresión elevada)
Kristiansen (2003) (113)	Ab-2, clon 24C02 (1:100)	76%	61%
Lee (2010) (86)	Ab-2, clon SN3b (1:100)	71%	39%
Majores (2015) (110)	SWA11 (1:100)	34%	NE*
	Ab-2, clon SN3b (1:50)	21%	NE*
Toro (2017)	Ab-2, clon SN3b (1:100)	54%	57%

Ac: Anticuerpo * El estudio no especifica punto de corte para "expresión elevada". Valora expresión de CD24 en términos de porcentaje de intensidad, considerando de manera separada positividad citoplasmática y de membrana.

7.2.1 Expresión de CD24 y distribución por tipos histológicos: En consonancia con otros estudios observamos mayor número de casos positivos para CD24 en ACA (48 de 84 casos, 57%) ($p=0,001$). Estos resultados concuerdan con hallazgos previos propios (resultados preliminares presentados a manera de póster en Congreso Anual de la USCAP 2014, San Diego) y de otros, que también señalan mayor expresión de CD24 en adenocarcinomas (*versus* carcinomas de células escamosas) en rangos que varían de 61% (serie de Kristiansen en 2003) (113) a 39% (serie de Lee en 2010) (86).

7.2.2 Expresión de CD24 y relación con supervivencia: La información concerniente a sobreexpresión de CD24 y su papel como marcador pronóstico independiente es heterogénea. Si bien en otros órganos como el ovario, los estudios son más

consistentes en señalar una asociación entre la mayor expresión de CD24 con peor supervivencia, en el pulmón los resultados son variables.

En 2003 Kristiansen en un estudio que incluye pacientes en estadios I-II y III postuló una asociación con menor supervivencia en relación con alta expresión de CD24 en pacientes con CPCNP (113). En su estudio, la expresión citoplasmática de CD24 en ACA fue un factor pronóstico independiente de SG, sin relación con tamaño tumoral, compromiso ganglionar o estadio (113).

El mismo grupo, en 2015, con un anticuerpo diferente de CD24 (SWA11), no observa la misma relación (110).

Resultados de un segundo grupo (86) en 2010 encontraron en el análisis de subgrupos histológicos, relación entre aumento de expresión de CD24 y peor supervivencia en ACA. El anticuerpo empleado fue Ab-2, clon SN3b.

Los resultados en nuestra serie son parcialmente consistentes con los estudios publicados; si bien en ACA observamos mayor expresión de CD24, encontramos una relación significativa entre el aumento de expresión y mayor SLE (120 meses *versus* 78 meses en los casos de baja expresión) ($p= 0,021$). Existen múltiples diferencias metodológicas en los estudios publicados que condicionan los resultados y que incluyen los diferentes anticuerpos empleados, diferentes diluciones, inclusión de casos heterogéneos con pacientes en estadios avanzados y casos con metástasis ganglionares (**Tabla 50**).

Los estudios que han relacionado positividad de CD24 con peor supervivencia explican sus hallazgos, al menos en parte, a la capacidad de CD24 de actuar como ligando de P-selectina, receptor de adhesión que se expresa en células endoteliales y plaquetas. Esta unión potenciaría la capacidad de inducción metastásica de CD24; sin embargo, no se ha demostrado una asociación entre estadio ganglionar y expresión de CD24.

En nuestra serie, la exclusión de pacientes con metástasis ganglionares no permite analizar tal relación, y es un posible condicionante de los resultados observados.

Tabla 50. CD24 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características.

Autor (año)	n	Estadio	Método	Corte	Alta expresión de CD24 y Supervivencia
Kristiansen (113)	89 (ACA: 49 CCE: 40)	I-III	Intensidad (expresión citoplasmática y de membrana)	Bajo (0-1) Alto (2-3)	Ac: SN3b ACA: menor SG
Lee (84)	267 (ACA: 165 CCE: 88 Otros: 14)	I-IV	Porcentaje: 0, 1: ≤10% 2: 11%-49% 3: >50 No intensidad.	Bajo 0-1 Alto 2-3 (>10%)	Ac: SN3b ACA: Menor SG y SLE
Majores (110)	137 (ACA: 102 CCE: 35)	I-III	-Intensidad -Comparan expresión citoplasmática y de membrana -Usan dos Ac diferentes: SWA11 y SN3b	Bajo (0-1) Alto (2-3)	SWA11: (sólo expresión de membrana), mayor SG en todos los CPCNP. No diferencias por subgrupos histológicos SN3b: No relación
Toro (2017)	140 (ACA: 84 CCE: 47 CCG: 9)	I-II (N0)	Porcentaje	10%	Ac: SN3b ACA: mayor SG

Ac: Anticuerpos. CPCNP: Carcinoma pulmonar de célula no pequeña. NS: no significativo

7.3 Expresión de ALDH1

La enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) pertenece a una familia de enzimas detoxificantes cuya función es convertir aldehídos en su correspondiente ácido carboxílico. Se ha establecido que diversas isoformas de ALDH juegan un papel en la biología de las células madre, entre las cuales resalta ALDH1, que es la más extensamente estudiada (89).

En el parénquima pulmonar no tumoral, observamos tinción de ALDH1 con intensidad variable en el epitelio bronquial, de acuerdo a lo descrito previamente (71, 95). La positividad de ALDH1 para todos los CPCNP fue de 64% (tinción citoplasmática).

7.3.1 Expresión de ALDH1 y distribución por tipos histológicos: observamos una mayor expresión de ALDH1 en CCE (77% positivos), lo cual es concordante con estudios previos (93, 95). Del total de casos de CCE, ALDH1 se expresó de manera predominante en los tumores queratinizantes ($p = 0,05$).

7.3.2 Expresión de ALDH1 y relación con supervivencia: Los primeros estudios sobre ALDH1 se hicieron empleando técnicas de aldeflúor y fluorescencia en cultivos celulares, con resultados diversos. Algunos (84), señalan que la mayor expresión está relacionada con resistencia a agentes de quimioterapia y comportamiento más agresivo, mientras que otros han relacionado la positividad para ALDH1 con mayor supervivencia (114).

Datos anteriores obtenidos por nuestro grupo (presentados en formato de póster, XXVII Congreso Nacional de la SEAP, 2015) señalaban una tendencia de menor supervivencia en casos de expresión negativa o baja (58%) *versus* casos positivos con valores altos (72%) ($p=0,19$).

El análisis de la serie actual confirma esta tendencia, mostrando mayor SG en los casos positivos. La SLE observada muestra diferencias significativas entre casos positivos (SLE=117 meses) *versus* negativos (SLE= 97 meses) ($p= 0,044$) (**Tabla 51**).

El análisis de supervivencia en ACA en nuestra serie no mostró relación con la expresión de ALDH1. En los CCE hubo una tendencia a mejor pronóstico (mayor SG y SLE) en los casos positivos, si bien sin significación estadística. Otros grupos han observado en ACA mayor SG en los casos positivos (114).

Tabla 51. ALDH1 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características.

Autor (año)	n	Estadio	Método	Corte	Alta expresión de ALDH1 y Supervivencia
Jiang 2009 (84)	59 (ACA: 30 CCE: 25 CCG: 4)	I	Porcentaje e intensidad (0-3: ninguna, leve, moderada, intensa)	Neg: ≤10% y 0- 1 int. Pos: >10% 2-3 int.	Correlación con mayor grado histológico y estadio (p<0,05)
Shien 2012 (71)	30 Con QT previa	IIIA IIIB	Porcentaje e intensidad (0-3: ninguna, leve, moderada, intensa)	Neg: ≤10% y 0- 1 int. Pos: >10% 2-3 int.	SG: menor (p= 0,042)
Alamgeer 2013 (95)	205 (ACA: 121 CCE: 84)	I	Porcentaje e intensidad (0-3: ninguna, leve, moderada, intensa)	Neg: ≤10% y 0- 1 int. Pos: >10% 2-3 int.	SG: menor (p=0,017) y SLE (p= 0,025) ACA: menor SG (p= 0,004*)
Shimada 2014 (114)	103 ACA	I-IV	Porcentaje de céls con expresión citoplasmática	5%	SG: mayor (p= 0,002*)
Toro (2017)	140 (ACA: 84 CCE: 47 CCG: 9)	I-II (N0)	Porcentaje	5%	SG: tendencia (NS) a mayor SG SLE: mayor (p= 0,044*).

Ac: Anticuerpos. Céls: Células. CPCNP: Cáncer de pulmón de célula no pequeña. Int: Intensidad. Neg: Negativo. NS: no significativo. Pos: Positivo. QT: Quimioterapia.

Los estudios difieren en cuanto a a criterios de inclusión (heterogeneidad en tipos histológicos, algunos sin especificar, estadios), anticuerpos empleados, dilución y punto de corte, así como a tipo de muestras analizadas, material de citología en algunos (84), secciones completas en otros o TMAs (**Tabla 52**).

Tabla 52. Anticuerpos anti ALDH1 empleados reportados en los diversos estudios

Referencia	Ac, clon y dilución	Dilución	Casa comercial	Casos positivos (global)
Jiang 2009 (84)	ALDH1 monoclonal conejo	NE	Santa Cruz Biotechnology	Global: 17/59 (29%) ACA: 8/30 (27%) CCE: 8/25 (32%) CCG: ¼ (25%)
Shien 2012 (71)	ALDH1 monoclonal conejo	1:400	Abcam	Global: 30/50 (60%) ACA: 13/20 (65%) CCE: 5/10 (50%)
Alamgeer, 2013 (95)	ALDH1A1, clon 44/ ALD	1:200	BD Transduction Laboratories	141/205 (69%)
Shimada 2014 (114)	ALDH1A1 Monoclonal, conejo. Clon NE	NE	Abcam	68 (66%)
Toro, 2017	ALDH1A1 Monoclonal, conejo. Clon EP 1933Y	1:100	Abcam	Global: 88/138 (64%) CCG: 7/9 (79%) CCE: 36/47 (77%) ACA: 45/82 (55%)

ACA: Adenocarcinoma. CCE: Carcinoma de células escamosas. CCG: Carcinoma de célula grande. NE: No especificado.

La considerable variabilidad en la metodología de los estudios disponibles condiciona la comparación con nuestros resultados; si bien existe evidencia que favorece el papel de ALDH1 como marcador asociado a mejor pronóstico (58), de manera similar a lo encontrado por nuestro grupo, hay también resultados que señalan lo contrario. Es necesario validar nuestros hallazgos en el contexto de estudios con criterios de inclusión homogéneos y metodología comparable.

7.4 Expresión de Sox2

Esta proteína de expresión nuclear cumple un papel central en la auto-renovación, diferenciación y reprogramación de células madre (115). En parénquima pulmonar no neoplásico, Sox2 se expresa en el epitelio bronquial normal, incluyendo células basales (116l) y estructuras alveolares bronquiolidadas y lesiones premalignas, precursoras de CCE (hiperplasia, displasia y carcinoma in-situ) (117). La expresión

es menor en bronquiolos terminales y ausente en células alveolares e hiperplasia adenomatosa atípica.

En pulmón tumoral, los estudios señalan un amplio rango de positividad, que en nuestra serie fue de 36% (43/120 casos), con predominio en hombres (40/95 hombres -42%- en comparación con 3/25 mujeres – 12%- p= 0,005) y fumadores (positivo en 42/105 (40%) casos *versus* 1/13 (8%) en no fumadores, p= 0,03).

Diferencias metodológicas condicionan la comparación, al contar con diversos puntos de corte y definiciones de positividad. Autores como Ying (115) en 2016, encontraron positividad de 77% en su serie de 127 pacientes, si bien incluían como positivo cualquier tipo de intensidad y porcentaje (**Tabla 53**).

Tabla 53. Anticuerpos anti Sox2 empleados reportados en los diversos estudios

Referencia	Ac, clon y dilución	Dilución	Casa comercial	Casos positivos (global)
Sholl, 2010 (116)	Anti Sox2, conejo, policlonal	1:500	Novus Biologicals	ACA: 50%
Wilbertz, 2011 (118)	Anti Sox2 AF2018 cabra, policlonal	1:40	R&D Systems	No reportado (mayor expresión en CCE; p= 0,001)
Brcic 2012 (97)	Anti Sox2 clon D6D9	1:100	Cell Signaling Technology	52/14 (79%)
Ying, 2016 (115)	ab97959	1:500	Abcam	Global: 53 (42%) ACA: 12 (27%) CCE: 25 (56%)
Toro, 2017	NB-110-37235	1:250	Novus	Global: 43/120 (36%) CCE: 33/37 (89%) CCG: 4/9 (44%) ACA: 6/74 (8%)

ACA: Adenocarcinoma. CCE: Carcinoma de células escamosas. CCG: Carcinoma de célula grande. NE: No especificado.

7.4.1 Expresión de Sox2 y distribución por tipos histológicos: Nuestros hallazgos señalan predominio de expresión en CCE (33/37 casos) ($p= 0,000$), y en relación con antecedentes de tabaquismo ($p= 0,03$).

La mayor positividad de Sox2 en CCE en comparación con ACA ha sido descrita previamente (115, 116, 119). Se ha identificado a SOX2 como un oncogén amplificado en carcinomas escamosos de esófago y pulmón (116).

En CPCNP, aproximadamente 90% de CCE y 20% de ACA presentan ganancias de número de copias en la región 3q26, punto de localización de SOX2 (119). El proyecto del Atlas Genómico del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*) ha descrito extensamente los perfiles moleculares de ACA y CCE pulmonares, y con base a su análisis sistemático se proponen subtipos genómicos de CPCNP (29). En el caso de CCE, la presencia de mayor número de copias y expresión de Sox2, subdivide estos carcinomas en subgrupos con diferencias moleculares claves intrínsecas a su biología.

7.4.2 Expresión de Sox2 y relación con supervivencia: Heterogeneidad en pacientes incluidos en los diferentes estudios, diversos métodos de valoración empleados, y diferencias en puntos de corte. Lo anterior genera resultados heterogéneos y difíciles de comparar (**Tabla 54**). Algunos estudios realizados tanto con técnicas de inmunofluorescencia (96) como de IHQ señalan que la positividad para Sox2 en los CCE se relaciona con mayor supervivencia ($p=0,001$) (115).

Considerando todos los tipos histológicos, en nuestra serie no se observaron diferencias en cuanto a SG; la SLE mostró una tendencia ($p= 0,08$) a mejor pronóstico en los casos positivos para Sox2. El análisis de supervivencia en los CCE no mostró diferencias en la supervivencia.

Si el impacto pronóstico de Sox2 guarda relación con el tipo histológico es una pregunta aún por responder. Algunos autores plantean que la expresión de Sox2 en CCE a nivel de proteína, así como su amplificación, se asocian con mejor pronóstico (97, 119, 120). Otros estudios afirman que el valor pronóstico de este oncogén es independiente del tipo histológico (29, 96).

Tabla 54. Sox2 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características.

Autor (año)	n	Estadio	Método	Corte	Positividad de SOX2 y Supervivencia
Sholl 2010 (116)	104 ACA	I	Porcentaje 0 = ausencia de tinción 1+ = <5% 2+ = 5-25% 3+ = 26-50% 4+ = > 50%	5%	ACA: Menor SG (p = 0,004) y SLE (p = 0,0006)
Wilbertz 2011 (118)	891 (ACA: 575 CCE: 316)	I-IV	Intensidad (valoración digital)	No reportado	ACA: No relación CCE: Mayor SG (p= 0,036) en análisis univariado. No relación en análisis multivariado
Brcic 2012 (97)	147 (ACA: 77 CCE: 70)	I-III	Porcentaje	≥5%	Global: mayor SG (p= 0,48) en análisis univariado. No relación en análisis multivariado
Ying 2016 (115)	127	I-III	Int: de 0 a 4. Porcentaje: 0 (≤5%) 1 (6-25%) 2 (26-50%) 3 (51-75%) 4 (76-100%)	Score: 0 = Neg 1-4 = Pos + 5-7 = Pos ++ ≥8 = Pos +++ "Alto": ++/+++ "Bajo": Neg / Pos +	Global: Mayor supervivencia a 5 años (p=0,001)
Toro 2017	140 (ACA: 84 CCE: 47 CCG: 9)	I-II (N0)	Porcentaje	10%	Global: SG sin diferencias SLE: mayor (p= 0,08). Análisis univariado.

Ac: Anticuerpos. Céls: Células. CPCNP: Cáncer de pulmón de célula no pequeña. Int: Intensidad. Neg: Negativo. NS: no significativo. Pos: Positivo. QT: Quimioterapia

7.5 Expresión de CD133

CD133 es producto de un único gen localizado en el cromosoma 4 (121). Células CD133+ difieren biológicamente de aquellas negativas en cuanto a resistencia a quimioterapia (siendo más resistentes las células positivas) y con peor pronóstico en tumores sólidos (122).

En pulmón, es posible identificar mediante IHQ tinción de tipo citoplasmático para CD133 en epitelio bronquial y macrófagos intraluminales, tal como demostramos en nuestras observaciones. La positividad en CPCNP es variable, según anticuerpos y puntos de corte usados, con rangos entre 15% (punto de corte de 10%, casos en estadios tempranos) (128) a 63% (punto de corte 20%, incluyendo estadios avanzados) (129). En nuestra serie, la positividad observada, el 38%, se sitúa en un punto intermedio.

7.5.1 Expresión de CD133 y distribución por tipos histológicos: La literatura no es concluyente respecto a la expresión de CD133 en relación con parámetros clínico-patológicos, como muestran Wu *et al* en los resultados de un meta-análisis publicado en 2014 (102); nosotros identificamos mayor número de casos positivos entre los ACA (46/83) mientras que sólo una minoría de CCE y CCG expresaron positividad para este marcador. También observamos una clara prevalencia de expresión en relación con hábito tabáquico (77% de pacientes fumadores con positividad para CD133) ($p=0,003$).

El estudio de la cohorte publicado por Alamgeer en 2013 (95) incluyó 205 pacientes con CPCNP estadio I, con un seguimiento mínimo de 18 meses, y mostró asociación entre la expresión de CD133 e histología de adenocarcinoma ($p=0.001$), más prevalente incluso entre el grupo de tumores en estadio IA ($p=0.023$). Otro meta-análisis publicado en 2014 (123) no encontró una relación concluyente entre expresión de CD133 y estadio tumoral y/o tipo histológico (**Tabla 55**). En este trabajo se incluyeron estudios que valoraron la expresión de CD133 mediante IHQ, en un grupo heterogéneo de CPCNP, sin uniformidad en estadios clínicos y con diversos puntos de corte.

Tabla 55. Meta-análisis del significado clínico-patológico de CD133. Características y metodología de estudios incluidos (123)

Primer autor	Año	Tipo histológico	Método	Punto de corte	n
Shien	2012	CPCNP	IHQ	Tinción >1%	30
Bertolini	2009	CPCNP	IHQ	Tinción intensa	58
Salnikov	2010	CPCNP	IHQ	Cualquier tinción	88
Li	2011	CPCNP	IHQ	Tinción >1%	145
Herpel	2011	CPCNP	IHQ	Expresión difusa o tinción clara en al menos 1 de 4 muestras (cores) por caso	86
Xu	2011	CPCNP	IHQ	Cualquier tinción	103
Wei	2008	CPCNP	IHQ	Tinción >10%	77
Li	2011	Tumores neuroendocrinos	IHQ	Tinción >10%	90
Yao	2010	Tumores pulmonares	IHQ	Tinción >10%	42
Lin	2009	Carcinomas escamosos	IHQ	Cualquier tinción	54
Gu	2010	CPCNP	IHQ	Tinción >10%	44
Cheng	2010	CPCNP	IHQ	Tinción >10%	65
Sun	2012	CPCNP	IHQ	Cualquier tinción	67

Se ha sugerido una relación entre CD133 y ALDH1, al existir cierto solapamiento entre las variables que cada marcador identifica. Alamgeer (95) estudió la coexpresión de ALDH1 y CD133 en CPCNP en estadios tempranos, encontrando que la co-expresión se asocia con un mayor riesgo de recaída.

Nuestros resultados no confirman estos hallazgos (grado de correlación entre ALDH1/CD133 de -0,049; $p=ns$) y la evidencia que los respalda tampoco es concluyente (92).

7.5.2 Expresión de CD133 y relación con supervivencia: Nuestros resultados señalan una tendencia a peor pronóstico (menor SLE) en casos positivos para CD133 (todos los tipos histológicos) ($p= 0,08$; resultados presentados a manera de póster, XXVIII Congreso Nacional de la SEAP, **Anexo II**), confirmando observaciones previas (95).

Si bien la mayoría de estudios señala el papel de CD133 como biomarcador condicionante de peor pronóstico, no hay consenso sobre su valor predictivo en el análisis por subgrupos histológicos. Algunos autores (101) le dan valor en ACA como marcador independiente de mal pronóstico, al tiempo que existe evidencia en el sentido contrario (ausencia de relación) (92). En nuestra serie el análisis de supervivencia por tipos histológicos no mostró diferencias significativas.

La dificultad en lograr resultados más concluyentes está relacionada con el uso de diferentes anticuerpos y clones de CD133, que reconocen diferentes dominios de la proteína (100, 124). Se plantea también la posibilidad de que el estado de glicosilación de CD133 condicione la capacidad de reconocimiento de los diversos clones empleados, modificando su sensibilidad.

7.6 Correlación entre expresión simultánea de marcadores

La utilidad de marcadores aislados como predictores pronósticos no está definida. En la **Tabla 56** presentamos el resumen de nuestras observaciones sobre la relación de cada marcador IHQ estudiado y su asociación con supervivencia.

Se observa que la positividad de CD24 en ACA se asocia con mejor pronóstico; en el mismo grupo histológico (ACA), la positividad para CD44v muestra (sin valores significativos) una tendencia a peor pronóstico. En el caso de ALDH1, su positividad se asoció a una mayor SLE en el conjunto de CPCNP.

Tabla 56. Marcadores de células madre estudiados y asociación con supervivencia. En rojo se señala el tipo histológico en que cada marcador se expresa predominantemente (29, 70, 74, 75, 78, 84, 86, 93, 95, 96, 109, 110, 113-116, 119)

Marcador	Todos los tipos histológicos		CCE		ACA	
	SG	SLE	SG	SLE	SG	SLE
CD44	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD44v	NS	NS	NS	NS	NS	Menor (tendencia)
CD24	NS	Mayor (tendencia)	NS	NS	NS	Mayor $p=0,021^*$
ALDH1	Mayor (tendencia)	Mayor $p=0,044^*$	Mayor (tendencia)	NS	NS	NS
SOX2	NS	Mayor (tendencia)	NS	NS	NS	NS
CD133	NS	Menor (tendencia)	NS	NS	NS	NS

CCE: Carcinoma de Células Escamosas. ACA: Adenocarcinoma. SG: Supervivencia global. SLE: Supervivencia libre de enfermedad. NS: No significativa

Previamente se ha señalado que la combinación de marcadores (CD44-CD44v / CD24 o CD44 / ALDH1) estratificaría mejor el conjunto de CPCNP que cada proteína por separado (89, 93). En este contexto, la coexpresión de CD44 / CD24 ha recibido especial atención (65, 125, 126). El fenotipo CD44⁺ / CD24⁻ define poblaciones de células madre específicas en carcinomas de mama, próstata y páncreas.

En el pulmón, en 2014, Sterlacci et al (65) demostraron que, si bien al considerar ACA y CCE conjuntamente, el fenotipo CD44⁺ / CD24⁻ no señalaba diferencias en SG, el análisis por separado de acuerdo a la histología, evidenciaba que los ACA con fenotipo CD44⁺ / CD24⁻ tenían peor SG.

Seleccionamos estudiar de manera conjunta CD24 y CD44v debido a que CD24 mostró efecto como factor protector en SLE en el grupo de ACA (p= 0,022). En este mismo grupo, CD44v mostró tendencia (p= 0,11) a comportarse como factor asociado a mal pronóstico. Ambas observaciones son además concordantes con la literatura y en nuestro análisis de correlación de variables exhibieron una relación inversa (Rho = -0,22; p= 0,01; resultados enviados para presentación oral, 29th European Congress of Pathology, **Anexo II).I**

Construimos así tres grupos de riesgo que estratifican los ACA y permiten diferenciar casos con pronóstico favorable, intermedio y desfavorable. Cuando CD24 es positiva, con independencia de la expresión o no de CD44v, el pronóstico en cuanto a SLE, es mejor (p= 0,006).

Cuando CD24 es negativa, la expresión de CD44V actúa como predictor: su negatividad condiciona un pronóstico intermedio, mientras que cuando CD44v es positiva, el pronóstico es desfavorable (**Tabla 57**).

Tabla 57. Grupos de riesgo en ACA combinando CD44v y CD24 (p =0,006).

Expresión de CD44v / CD24	Grupo	N	SLE (meses)
CD44v: +/- CD24: +	Favorable	48	120
CD44v: - CD24: -	Intermedio	22	93
CD44v: + CD24: -	Desfavorable	13	55

Tenemos entonces que el fenotipo CD24 / CD44 define en los ACA tres grupos con pronóstico diferente en cuanto a SLE:

- 1) Favorable: CD44v^{POS/NEG} y CD24^{POS}
- 2) Intermedio: CD44v^{NEG} y CD24^{NEG}
- 3) Desfavorable: CD44v^{POS} y CD24^{NEG}

El carecer de marcadores relacionados con pronóstico en estadios tempranos de CPCNP no permite la validación de nuestras conclusiones en el análisis multivariado.

Nuestras conclusiones son coherentes con observaciones de otros grupos que han encontrado baja expresión de células CD44^{POS} / CD24^{NEG} en tejido normal, en comparación con tejido tumoral (125). Otros también han identificado el fenotipo CD44^{POS} / CD24^{NEG} como factor de riesgo asociado a peor SG en tumores sólidos como mama (64, 82), páncreas (76), y de manera más reciente, en CCE de cabeza y cuello (125).

En el pulmón no hay estudios similares para comparar nuestros hallazgos. La serie de Sterlacci, publicada en 2014 (65) analizó información de 371 casos (215 ACA y 123 CCE) estadios I-IV. Encontró que los ACA CD44^{POS} / CD24^{NEG} tenían una SG significativamente inferior que los CD44^{NEG} / CD24^{POS}. No reportan el uso de CD44v.

7.7 Limitaciones

Algunos factores condicionan nuestros resultados. El primero es debido a que se trata de un estudio retrospectivo por lo que sus conclusiones deben interpretarse en este contexto.

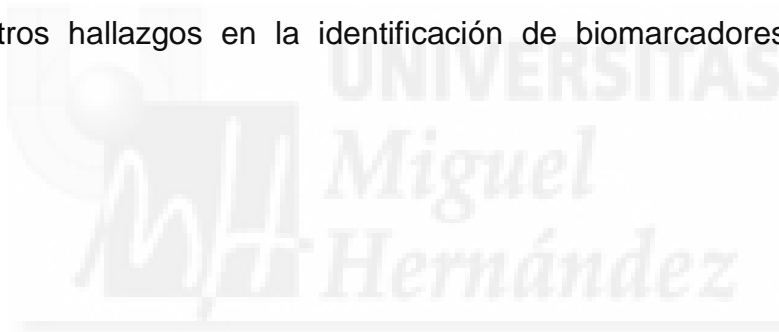
Una segunda limitación se relaciona con el empleo de TMAs que no son el método diagnóstico estándar y que pueden estimar de manera inadecuada la heterogeneidad tumoral; la obtención de dos cilindros por caso de áreas diferentes ha intentado minimizar esta limitación. Adicionalmente, la aplicación de criterios rigurosos de inclusión condicionó el número final de pacientes incluidos en nuestra serie. Lo anterior indica que los resultados obtenidos deberán ser validados en una serie más amplia, lo que sería objetivo de desarrollo en un nuevo proyecto dentro de la línea de investigación.

Debemos considerar también las limitaciones propias a la técnica aplicada, ya que no existen procedimientos inmunohistoquímicos estandarizados con los anticuerpos utilizados en lo referente a diluciones, sistemas de visualización o recuperación antigénica. También hay subjetividad en la interpretación de los resultados al no disponerse de definiciones claras de positividad y negatividad. Empleamos una

valoración cuantitativa, que en conjunto con un método semicuantitativo con la construcción de un *score*, son los más empleados para analizar biomarcadores (127). Esta estrategia es sin embargo, subjetiva y puede condicionar variabilidad inter-observador y podría ser una de las razones de las discrepancias observadas en la literatura.

El análisis de nuestros resultados están limitados también por la significativa heterogeneidad de la literatura disponible, que analiza amplios grupos de pacientes en diversos estadios, y con técnicas variables. Los anticuerpos empleados por los diferentes grupos de trabajo difieren no solo en cuanto a su origen, sino que tampoco hay consenso sobre dilución y punto de corte.

Es evidente que es necesario continuar los trabajos que permitan clarificar el papel de los marcadores de CMCs, y de manera especial, de acuerdo a nuestros resultados, de la combinación CD44-CD44v / CD24 en la progresión tumoral y conocer sus diversas funciones dependientes de cada órgano, para eventualmente traducir nuestros hallazgos en la identificación de biomarcadores de relevancia clínica.





8. CONCLUSIONES

1. La aplicación de técnicas de inmunohistoquímica como p40 y TTF1 permitió la reclasificación del 64% de los casos inicialmente diagnosticados como CPCNP tipo no especial y CCG.
2. Los 6 marcadores de células madre estudiados se expresaron de manera amplia en el grupo de CPCNP en estadios iniciales (en un rango entre 36%, Sox2 y 64%, ALDH1). El nivel de correlación entre todos los marcadores fue moderado, pero estadísticamente significativo.
3. Sox2 se expresó mayoritariamente en hombres y en pacientes fumadores. CD133 fue más frecuente en fumadores. Los demás marcadores no demostraron una relación significativa con las variables clínicas.
4. CD44 y CD44v se expresaron predominantemente en CCE, con un patrón de tinción de membrana. Por el contrario CD24 se expresó más frecuentemente en ACA, con tres diferentes patrones de tinción: de membrana, citoplasmático y luminal.
5. ALDH1 se expresó en la mayoría de CCG y CCE, mientras que la mitad de ACA fueron positivos para este marcador. El patrón de expresión fue citoplasmático.
6. Sox2 fue positivo, con patrón nuclear, en la mayoría de CCE. Por el contrario, CD133 fue positivo en 55% de los ACA y negativo en la mayoría de CCE y CCG, con patrón de tinción citoplasmático.
7. En relación con marcadores de proliferación celular se observó un moderado nivel de correlación positiva entre los valores de Ki67 y la expresión de Sox-2, ALDH1, CD44 y CD44v y de correlación negativa con CD24 y CD133.
8. La expresión de CD24 se relacionó, en ACA pulmonares en estadios iniciales, con mayor supervivencia libre de enfermedad.
9. El estudio inmunohistoquímico combinado de CD44v y CD24 en ACA de pulmón en pacientes intervenidos en estadios iniciales permitió su estratificación en tres grupos con diferente pronóstico en cuanto a supervivencia libre de enfermedad.



9. REFERENCIAS

1. Las cifras del cáncer en España 2016. SEOM [Internet]. Disponible en: <http://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105460-el-cancer-en-espana-2016>.
2. Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Disponible en: <http://www.ine.es/>
3. Malvezzi M, Bosetti C, Rosso T, Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Lung cancer mortality in European men: trends and predictions. *Lung Cancer*. 2013;80:138-45.
4. Bosetti, Malvezzi M, Rosso T, Bertuccio P, Gallus S, Chatenoud L, et al. Lung cancer mortality in European women: trends and predictions. *Lung Cancer*. 2012;78:171-8.
5. Isla D, Majem M, Viñolas N, Artal A, Blasco A, Felip E. A consensus statement on the gender perspective in lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2016. Published ahead of print. DOI 10.1007/s12094-016-1578-x.
6. Printz C. Lung cancer new leading cause of death for women in developed countries. *Cancer*. 2015;121:1911-1912. DOI: 10.1002/cncr.28995.
7. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385:977–1010.
8. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
9. World Cancer Research World International [Internet]. Disponible en: <http://www.wcrf.org/>
10. Rajer M, Zwitter M, Rajer B. Pollution in the working place and social status: co-factors in lung cancer carcinogenesis. *Lung Cancer*. 2014;85:346-50. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.06.012.
11. Johnson AM, Hines RB, Johnson JA, Bayakly AR. Treatment and survival disparities in lung cancer: the effect of social environment and place of residence. *Lung Cancer*. 2014;83:401-7.
12. Yang J, Zhu YH, Chen YS, Ding LL, Kensler TW, Chen JG. Lung Cancer in a

- Rural Area of China: Rapid Rise in Incidence and Poor Improvement in Survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:7295-302.
13. Okamoto T, Suzuki Y, Fujishita T, Kitahara H, Shimamatsu S, Kohno M, et al. The prognostic impact of the amount of tobacco smoking in non-small cell lung cancer--differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2014;85:125-30.
14. National Cancer Institute [Internet]. Disponible en: www.cancer.gov
15. Pikor L, Ramnarine V, Lam S, Lam W. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer.* 2013;82:179–189.
16. Geisinger K, Moreira AL, Nicholson AG, Rami-Porta R, Travis W.D. Tumours of the lung. En: Travis WD, Brambilla E., Burke A, Marx A, Nicholson A (Eds.): *Who Classification of Tumours of Lung, Pleural, Thymus and Heart.* 4th edition. Lyon: IARC Press; 2015. p 10-151.
17. Rami-Porta R, Asamura H, Travis W, Rusch V. Lung Cancer. Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging. 2017;67 :138–155.
18. Liu X, Cho W. Precision medicine in immune checkpoint blockade therapy for non-small cell lung cancer. *Clin Trans Med.* 2017;6:7. DOI 10.1186/s40169-017-0136-7
19. Cheng L, Alexander R, MacLennan G, Cummings O, Montironi R, López-Beltrán A et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol.* 2012: 347-369.
20. Simon G, Silvestre G. You just can't call it lung cancer anymore. *J Thor Oncol.* 2011;6:239-240.
21. Travis W, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thor Oncol.* 2011;6: 244-285.
22. Travis W.D, Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (3th edition).* IARC Press: Lyon 2004.

23. Yoshizawa A, Motoi N, Riely G, Sima C, Gerald W, Kris M. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011;24:653-64.
24. Ho C, Tong KM, Ramsden K, Ionescu DN, Laskin J. Histologic classification of non-small-cell lung cancer over time: reducing the rates of not-otherwise-specified. *Curr Oncol*. 2015;22:e164-70. DOI: 10.3747/co.22.2339.
25. Micke P, Mattsson JS, Djureinovic D, Nodin B, Jirström K, Tran L. The Impact of the Fourth Edition of the WHO Classification of Lung Tumours on Histological Classification of Resected Pulmonary NSCCs. *J Thor Oncol*. 2016;11:862-872.
26. Veldore VH, Patil S, Satheesh CT, Shashidhara HP, Tejaswi R, Prabhudesai SA, et al. Genomic profiling in a homogeneous molecular subtype of non-small cell lung cancer: An effort to explore new drug targets. *Indian J Cancer* 2015;52:243-8.
27. Bernicker E. Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: A Clinician's Perspective. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139:448-450.
28. Shames D, Wistuba I. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol*. 2014;232:121-133. DOI: 10.1002/path.4275
29. Chen F, Zhang Y, Rodriguez J, Behrens C, Akbani R, Lu Y et al. Multiplatform-based molecular subtypes of non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2017; 36:1384-1393. DOI:10.1038/onc.2016.303.
30. Rekhtman N, Tafe L, Chaft J, Wang L, Arcila M, Colanta A et al. Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2013;26:511-522.
31. Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N, et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer*. 2009;65:355-62.
32. Yu Y, Liu H, Zheng S, Ding Z, Chen Z, Jin W, Wang L, et al. Gender susceptibility for cigarette smoking-attributable lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer*. 2014;85:351-60. DOI: 10.1016/j

33. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer*. 2016;102:122-134. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.10.010.
34. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129–2139.
35. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1367-80.
36. Dacic S, Shuai Y, Yousem S, Ohori P, Nikiforova M. Clinicopathological predictors of EGFR/KRAS mutational status in primary lung adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2010;23:159-168.
37. Han W, Du Y. Recent Development of the Second and Third Generation Irreversible EGFR Inhibitors. *Chem Biodivers*. 2017 (Published ahead of print). doi: 10.1002/cbdv.201600372.
38. López-Ríos F, de Castro J, Concha A, Garrido P, Gómez-Román J, Isla D, et al. Actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón avanzado de célula no pequeña. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Rev Esp Patol*. 2015;48:80-9. DOI: 10.1016/j.patol.2014.10.005
39. Kerr KM, López-Ríos F. Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol*. 2016; Suppl 3:iii16-iii24. DOI: 10.1093/annonc/mdw302
40. Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A, Garrido P, García-Campelo R, Biscuola M et al. Accurate Identification of ALK Positive Lung Carcinoma Patients: Novel FDA-Cleared Automated Fluorescence In Situ Hybridization Scanning System and Ultrasensitive Immunohistochemistry. *PLoS ONE*. 2014; 9:e107200. DOI:10.1371/ journal.pone.0107200.

41. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol.* 2014; 27:711-720.
42. Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, Ou SI. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer.* 2017;103:27-37. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.11.011
43. Koh J, Go H, Keam B, Kim M-Y, Nam SJ, Kim TM, et al. Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol.* 2015;28:1154-1166.
44. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1540–50.
45. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2016. Publicado on-line: diciembre 12 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32517-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32517-X)
46. Jones K. D. Un update on Lung Cancer Staging. *Adv Anat Pathol.* 2010;17:33-37.
47. Solan M., Werner-Wasik M. Prognostic factors in Non-small cell Lung Cancer. *Semn Surg Oncol.* 2003;21:64-73.
48. Kadota K, Suzuki K, Kachala S, Zabor E, Sima C, Moreira A et al. A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25:1117–1127.
49. Barletta J.A., Yeap BY, Chirieac LR. Prognostic significance of grading in lung adenocarcinoma. *Cancer.* 2010;116:659-669.

50. Ferreira LM, Reis MM, Palomino SA, Farhat C, Takagaki TY *et al.* Prognostic Values of Stromal Proportion and PCNA, Ki-67, and p53 Proteins in Patients with Resected Adenocarcinoma of the Lung. *Mod Pathol* 2000;13:511–520.
51. Warth A, Cortis J, Soltermann A, Meister M, Budczies J, Stenzinger A, *et al.* Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *Bri J Cancer*. 2014;111:1222–1229.
52. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert A-P, *et al.* Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *B J Cancer*. 2004;91, 2018–2025.
53. Meert A-P, Martin B, Verdebout J-M, Paesmans M, Berghmans T, Ninane V. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2004;44:295—301.
54. Wen S, Zhou W, Li CM, Hu J, Hu XM, Chen P. Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies. *BMC Cancer*. 2015;15:520. DOI: 10.1186/s12885-015-1524-2
55. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501:338-45. DOI: 10.1038/nature12625
56. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*. 2015;27:15-26. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.12.001
57. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J., Terzis AJ. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:899-904.
58. De Bruin E, McGranahan N, Swanton C. Analysis of intratumor heterogeneity unravels lung cancer evolution. *Mol Cell Oncol*. 2015;2:e985549.
59. Cirkel GA, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Koudijs MJ, Willems SM, Voest EE.. Tumor heterogeneity and personalized cancer medicine: are we being outnumbered? *Future Oncol*. 2014;10:417-28. DOI: 10.2217/fon.13.214

60. Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, et al. Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines. PLoS ONE. 2013 8(3):e57020. DOI:10.1371/journal.pone.0057020
61. Kreso A, Dick J. Evolution of the cancer stem cell model. Cell Stem Cell. 2014; 4:275-291.
62. Chaffer, CL et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. Cell. 2013;154:1–7.
63. Skidan I, Steiniger SCJ. In vivo models for cancer stem cell research: a practical guide for frequently used animal models and available biomarkers. Journal of physiology and pharmacology. 2014;65:157-169.
64. Visvader J, Lindeman G. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nature Reviews. 2008;8:755-768.
65. Sterlacci W, Savic S, Fiegl M, Obermann E, Tzankov A. Putative stem cell markers in non-small cell lung cancer. J Thor Oncol. 2014;9:41-49.
66. Alamgeer M, Peacock C, Matsui W, Ganju V, Watkins N. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. Respirology. 2013;18:757–764 DOI: 10.1111/resp.12094.
67. -Sourisseau T, Hassan K, Wistuba I, Penault-Llorca F, Adam J, Deutsch E, et al. Lung Cancer Stem Cell: Fancy Conceptual Model of Tumor Biology or Cornerstone of a Forthcoming Therapeutic Breakthrough? J Thorac Oncol. 2014;9:7–17.
68. MacDonagh LG, Finn SP, Cuffe S, Barr MP. Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. Pharmacol Ther. 2016;158:71-90.
69. Moreira A, Gonen M, Rehtman N, Downey R. Progenitor stem cell marker expression by pulmonary carcinomas. Mod Pathol. 2010;23:889-895.
70. Situ D, Long H, Lin P, Zhu Z, Wang J, Zhang X et al. Expression and prognostic relevance of CD44v6 in stage I non-small cell lung carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2010;136:1213–1219.

71. Shien K, Toyooka S, Ichimura K, Soh J, Furukawa M, Mak Y, et al. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer*. 2012;77:162–167.
72. Larzabal L, El-Nikhely N, Redrado M, Seeger W, Savai R, Calvo A. Differential effects of drugs targeting Cancer Stem Cells (CSC) and Non-CSC Populations on Lung Primary Tumors and Metastasis. *PLOS ONE*. 2013;8:e79798.
73. Kodama H, Murata S, Ishida M, Yamamoto H, Yamaguchi T, Kaida S. Prognostic impact of CD44-positive cancer stem-like cells at the invasive front of gastric cancer. *Br J of Cancer*. 2017;116:186–194. DOI:10.1038/bjc.2016.401.
74. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stems Cells Translational Medicine*. 2015;4:1033–1043.
75. Roudi R, Madjd Z, Korourian A, Mehrazma M, Molanae S, Nasrollahzadeh M et al. Clinical significance of putative cancer stem cell marker CD44 in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Biomarkers*. 2014; 14:457-467.
76. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012;708036. DOI: 10.1155/2012/708036.
77. Jijiwa M, Demir H, Gupta S, Leung C, Joshi K, Orozco N. CD44v6 Regulates Growth of Brain Tumor Stem Cells Partially through the AKT-Mediated Pathway. *PLoS* 2011; 6: e24217. DOI:10.1371/journal.pone.0024217.
78. Zhao S, He J-L, Qiu Z, Chen N-Y, Luo Z, Chen B-J et al. Prognostic value of CD44 variant exon 6 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15:6761-6766.
79. Kerr K, Nicolson M. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:249–254. DOI: 10.5858/arpa.2015-0303-SA
80. Sholl L. Protein correlates of molecular alterations in lung adenocarcinoma: Immunohistochemistry as a surrogate for molecular analysis. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2015;32: 325–333.

81. Li Y, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:1839-44. DOI: 10.1073/pnas.1424171112
82. Schatton T, Frank N, Frank M. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*. 2009;31:1038–1049. DOI:10.1002/bies.200900058.
83. Suzuki H, Yamashiro K. Reduced expression of CD44v3 and v6 is related to invasion in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2002;38:137-41.
84. Jiang H, Zhao W, Shao W. Prognostic value of CD44 and CD44v6 expression in patients with non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014;35:7383-7389.
85. Pallegar NK, Ayre DC, Christian SL. Repression of CD24 surface protein expression by oncogenic Ras is relieved by inhibition of Raf but not MEK or PI3K. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:47. DOI: 10.3389/fcell.2015.00047
86. Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung S-W, Lee C-T, et al. CD24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-small Cell Lung Carcinomas. *J Thor Oncol*. 2010;5:649-657.
87. Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Zadorozhny V, Fakhrai H. CD24+/CD38- as new prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Multidiscip Respir Med*. 2013;8:65.
88. Balicki D. Moving Forward in Human Mammary Stem Cell Biology and Breast Cancer Prognostication Using ALDH1. *Cell Stem Cell*. 2007;1:485-487. DOI 10.1016/j.stem.2007.10.015
89. Marcatto P, Dean C, Giacomantonio CA, Lee. Aldehyde dehydrogenase Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. 2011;10:1378-1384.
90. Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, et al. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Mod Pathol*. 2013;26:117-124.
91. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde Dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7:330-338. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-08-0393

92. Sullivan J, Spinola M, Dodge M, Raso M, Behrens C, Gao B, et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on Notch signaling. *Cancer Res.* 2010;70:9937–9948. DOI:10.1158/0008-5472
93. Dimou A, Neumeister V, Agarwal S, Anagnostou V, Syrigos K, Rimm D. Measurement of Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression Defines a Group with Better Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Pathol.* 2012;181:1436-1442.
94. López-González A, Salas C, Provencio M, Córdoba M, Gamallo C. Aldehyde dehydrogenases in early stage lung cancer: nuclear expression. *Clin Transl Oncol.* 2014;16:931-934.
95. Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell P, Prodanovic Z, Kumar B et al. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax.* 2013;68:1095-1104.
96. Velcheti V, Schalper K, Yao X, Cheng H, Kocoglu M, Dhodapkar K, et al. High SOX2 Levels Predict Better Outcome in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *PLOS One.* 2013;8:e61427.
97. Brcic L, Sherer C, Shuai Y, Hornick J, Chirieac L, Dacic S. Morphologic and Clinicopathologic Features of Lung Squamous Cell Carcinomas Expressing Sox2. *Am J Clin Pathol.* 2012;138:712-718.
98. Sholl L, Barletta J, Yeap B, Chirieac L, Hornick J. Sox2 Protein Expression is an Independent Poor Prognostic Indicator in Stage I Lung Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1193–1198.
99. Shmelkov S, Butler J, Hooper A, Hormigo A, Kushner J, Milde T et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133–metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008;118:2111-2120.
100. Hermansen S, Christensen K, Jensen S, Kristensen B. Inconsistent Immunohistochemical Expression Patterns of Four Different CD133 Antibody Clones in Glioblastoma. *J Histochem Cytochem.* 2011;59: 391–407.
101. Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M et al. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4:32-42.

102. Wu H, Qi X, Yan G, Zhang Q, Xu C, Bian X. Is CD133 Expression a Prognostic Biomarker of Non-Small-Cell Lung Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE. 2014;9:e100168. DOI: 10.1371/journal.pone.0100168
103. Wang W, Chen Y, Deng J, Zhou J, Zhou Y, Wang S et al. The prognostic value of CD133 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Tumor Biol. 2014;35:9769–9775.
104. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC Cancer Staging Manual. Seventh Edition. Chicago: Springer; 2010.
105. Dacic S. Lung Carcinoma Staging Update. Arch Pathol Lab Med. 2016 (Early on-line release). DOI: 10.5858/arpa.2016-0387-RA
106. Borczuk A., Qian F., Kazeros A., Eleazar J., Assaad A., Sonnett J. Invasive size is an independent predictor of survival in pulmonary adenocarcinoma. Am J Surg Pathol. 2009;33:462-469.
107. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:2014-21.
108. Vargas A, Harris C. Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. Nature Reviews. 2016;16: 525-537.
109. Ko YH, Won HS, Kyoung EJ, Hong SH, Roh SY, Hong YS, et al. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 2011;11:340.
110. Majores M, Schindler A, Fuchs A, Stein J, Heukamp L, Altevogt P et al. Membranous CD24 expression as detected by the monoclonal antibody SWA11 is a prognostic marker in non-small cell lung cancer patients. BMC Clinical Pathology. 2015;16:15-19. DOI: 10.1186/s12907-015-0019-z. eCollection 2015.
111. Huang X-L, Xu D-H, Wang G-P, Zhang S, Yu C-G. Associations between CD24 gene polymorphisms and inflammatory bowel disease: A meta-analysis World J Gastroenterol. 2015;21:6052–6059. DOI: 10.3748/wjg.v21.i19.6052

112. Thomas S, Harding M, Smith S, Overdevest J, Nitz M, Frierson H, et al. CD24 Is an Effector of HIF-1–Driven Primary Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2012;72:5600-12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3666.
113. Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2003;88:231–236.
114. Shimada Y, Saji H, Nomura M, Matsubayashi J, Koichi Y, Kakihana M. Cancer stem cell-related marker expression in lung adenocarcinoma and relevance of histologic subtypes based on IASLC/ATS/ERS classification. *OncoTargets and Ther.* 2013;6:1597–1604.
115. Ying J, Shi C, Li, C-S, Hu L-P, Zhang W-D. Expression and significance of SOX2 in non-small cell lung carcinoma. *Oncology Letters.* 2016;12:3195-3198.
116. Sholl L, Long K, Hornick J. Sox2 Expression in Pulmonary Non-small Cell and Neuroendocrine Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18:55–61.
117. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis L, et al. Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) Is a Potential Cell-Lineage Gene Highly Expressed in the Pathogenesis of Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *PLoS ONE.* 2010;5: e9112. DOI:10.1371/journal.pone.0009112
118. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K Stiedl A-C, Scheble V, Maier S. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2011;24:944–953. DOI:10.1038/modpathol.2011.49
119. Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembelé D. SOX2 Is an Oncogene Activated by Recurrent 3q26.3 Amplifications in Human Lung Squamous Cell Carcinomas. *PLoS One.* 2010: 5: e8960.
120. Chen Y, Huang Y, Huang Y, Chen J, Shouyu W, Zhou J. The Prognostic Value of SOX2 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013.8(8):e71140. DOI:10.1371/journal.pone.0071140
121. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hemotol Oncol* 2013;2:17.

122. Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question?. *Am J Transl Res.* 2013;5:563-581.
123. Tan Y, Chen B, Xu W, Zhao W, Wu J. Clinicopathological significance of CD133 in lung cancer: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2014;2:111-115. DOI: 10.3892/mco.2013.195
124. Qu H, Li R, Liu Z, Zhang J, Luo R. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:2644-2650.
125. Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N. CD44 high CD24 low molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res.* 2016;16: 405–417.
126. Ayre DC, Pallegar NK, Fairbridge NA, Canuti M, Lang AS, Christian SL. Analysis of the structure, evolution, and expression of CD24, an important regulator of cell fate. *Gene.* 2016;590:324–337.
127. Miller TJ, McCoy MJ, Hemmings C, Bulsara MK, Iacopetta B, Platell CF. Objective analysis of cancer stem cell marker expression using immunohistochemistry. *Pathology.* 2017 January;49: 24–29.
128. Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel P, Meister M, et al. The Cancer Stem Cell Antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT Are Not Associated with Prognosis in Resected Early-stage Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research.* 2011; 31: 4491-4500.
129. Salnikov A, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Intern J Cancer.* 2010;126: 950–958.





ÍNDICE DE FIGURAS

En Introducción

Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en España para 2020

Figura 2. Muertes en España por causas oncológicas en 2012

Figura 3. Variabilidad geográfica en tasa de mortalidad por cáncer de pulmón

Figura 4. Supervivencia a 5 años de acuerdo a la 8ª edición TNM

Figura 5. Evolución de la clasificación histológica de los tumores pulmonares

Figura 6. Flujo diagnóstico propuesto para manejo de la muestra en cáncer de pulmón

Figura 7. Mutaciones genéticas conductoras en ACA y CCE pulmonares

Figura 8. Heterogeneidad intratumoral

Figura 9. Modelo de Células Madre Cancerosas y modelo estocástico

Figura 10. Genética, epigenética y microambiente

Figura 11. Dominio extracelular de CD44

Figura 12. Vía de señalización del ácido retinoico y papel de ALDH

Figura 13. Estructura de CD133

En Material y Métodos

Figura 14. Carcinoma de células escamosas queratinizante (A) y no queratinizante (B)

Figura 15. Construcción de TMAs

En Resultados

Figura 16. Algoritmo de trabajo

Figura 17. Total de casos clasificados como CCG tras revisión morfológica (H&E) inicial (n=25) y reclasificación tras aplicación de panel IHQ

Figura 18. Distribución de la serie por tipos histológicos

Figura 19. Distribución de ACA por subtipos histológicos

Figura 20. Patrón de expresión de CD44 en células tumorales

Figura 21. Expresión elevada de CD44 por tipos histológicos

Figura 22. Expresión de CD44 en CCE bien diferenciado

Figura 23. Expresión de CD44 en ACA

Figura 24. Expresión de CD44v en parénquima pulmonar no neoplásico

Figura 25. Diferencias en expresión elevada de CD44v por tipos histológicos

Figura 26. Expresión de CD44v en CCE

Figura 27. Expresión de CD44v en ACA

- Figura 28.** Expresión de CD24 en parénquima pulmonar no tumoral
- Figura 29.** Expresión de CD24 en áreas tumorales
- Figura 30.** Diferencias en expresión elevada de CD24 por tipos histológicos
- Figura 31.** Expresión de CD24 en ACA
- Figura 32.** Expresión de CD24 en CCE
- Figura 33.** Expresión de ALDH1 en parénquima pulmonar no neoplásico
- Figura 34.** Expresión de ALDH1 según tipos histológicos
- Figura 35.** Expresión de ALDH1 en CCE
- Figura 36.** Expresión de ALDH1 en ACA
- Figura 37.** Expresión nuclear de Sox2 en CCE
- Figura 38.** Expresión elevada de Sox2 por tipos histológicos
- Figura 39.** Expresión de Sox2 en CCE
- Figura 40.** Expresión de Sox2 en ACA
- Figura 41.** Expresión de CD133 en epitelio bronquial y macrófagos intraluminales
- Figura 42.** Expresión de CD133 por tipos histológicos
- Figura 43.** Patrón de expresión de CD133 en ACA
- Figura 44.** Expresión de CD133 en CCE
- Figura 45.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de CD44v en ACA. Seguimiento en meses
- Figura 46.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia según expresión de CD24 en todos los grupos histológicos
- Figura 47.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de CD24 en ACA. Seguimiento en meses
- Figura 48.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia según expresión de ALDH1 en todos los grupos histológicos
- Figura 49.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad según expresión de Sox2 en todos los grupos histológicos
- Figura 50.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en ACA: CD24+ *versus* CD24-/CD44v- *versus* CD24-/CD44v+. Seguimiento en meses
- Figura 51.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en ACA: grupo de riesgo bajo y medio *versus* grupo desfavorable. Seguimiento en meses

En Discusión

- Figura 52.** Expresión de CD24 (mediante IHQ) en carcinoma de vejiga



ÍNDICE DE TABLAS

En Introducción

- Tabla 1.** Tumores más frecuentes en España y distribución por sexo (2012)
- Tabla 2.** Muertes por cáncer de pulmón en España. Evolución 1980-2005
- Tabla 3.** Cáncer de pulmón: cifras extraídas del informe global de cáncer, 2016
- Tabla 4.** Clasificación OMS (2015) de los tumores epiteliales de pulmón
- Tabla 5.** Alteraciones moleculares y agentes terapéuticos específicos
- Tabla 6.** Funciones de CD44s
- Tabla 7.** Expresión de CD44: variantes y significado
- Tabla 8.** Expresión de ALDH en diversas neoplasias
- Tabla 9.** Principales limitaciones de las dos técnicas más empleadas para la identificación de CMCs

En Material y Métodos

- Tabla 10.** Subclasificación de ACA según el *IASLC Staging Committee*
- Tabla 11.** Estadios I, II y III de la clasificación TNM para carcinomas del pulmón
- Tabla 12.** Clasificación de adenocarcinomas según grado de diferenciación por tipos histológicos.
- Tabla 13.** Características de CCE queratinizantes y no queratinizantes
- Tabla 14.** Panel de anticuerpos y controles empleados
- Tabla 15 .** Controles empleados y patrón de tinción en tejido control
- Tabla 16.** Tipo de tinción valorada en cada uno de los anticuerpos seleccionados y punto de corte
- Tabla 17.** Criterios para valoración de anticuerpos de diferenciación histológica.
- Tabla 18.** Gastos asociados al proyecto

En Resultados

- Tabla 19.** Casos identificados. Características clínicas y patológicas (n= 140)
- Tabla 20.** Tipos histológicos y variables clínico-patológicas
- Tabla 21.** Cuantificación de mitosis y expresión de Ki67 y p53 (todos los tipos histológicos)
- Tabla 22.** Expresión de CD44 (todos los tipos histológicos) y correlación con variables patológicas
- Tabla 23.** Expresión de CD44 y relación con variables proliferativas y expresión de p53

- Tabla 24.** Diferencias en expresión de CD44 por subtipos de CCE
- Tabla 25.** Expresión de CD44v (en todos los tipos histológicos) y correlación con variables patológicas
- Tabla 26.** Expresión de CD44v y relación con variables proliferativas y expresión de p53
- Tabla 27.** Diferencias en expresión de CD44v por subtipos de CCE
- Tabla 28.** Expresión de CD44v en ACA de patrón sólido
- Tabla 29.** Expresión de CD24 (≥ 10) en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas
- Tabla 30.** Expresión de CD24 y relación con variables proliferativas y expresión de p53
- Tabla 31.** Expresión de CD24 en ACA de patrón sólido
- Tabla 32.** Diferencias en expresión de CD24 por subtipos de CCE
- Tabla 33.** Expresión de ALDH1 en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas
- Tabla 34.** Expresión de ALDH1 y correlación con variables proliferativas y expresión de p53
- Tabla 35.** Diferencias en expresión de ALDH1 por subtipos de CCE
- Tabla 36.** Expresión de ALDH1 en ACA según grado de diferenciación
- Tabla 37.** Expresión de Sox2 en todos los tipos histológicos y correlación con variables patológicas
- Tabla 38.** Expresión de Sox2 y correlación con variables proliferativas y expresión de p53
- Tabla 39.** Diferencias en expresión de Sox2 por subtipos de CCE
- Tabla 40.** Expresión de Sox2 en ACA según subtipo histológico
- Tabla 41.** Expresión de CD133 y correlación con variables clínicas
- Tabla 42.** Expresión de CD133 y relación con variables proliferativas y p53
- Tabla 43.** Resultados del análisis de correlación de Spearman
- Tabla 44.** Correlación entre marcadores de células madre y variables proliferativas
- Tabla 45.** ACA (n =83) agrupados según expresión de CD44v y CD24 y SLE.
- Tabla 46.** Grupos de riesgo combinando CD44v y CD24

En Discusión

Tabla 47. Estudios incluidos en meta-análisis de CD44, realizados en tejido incluido en parafina con valoración mediante IHQ

Tabla 48. Estudios incluidos en dos meta-análisis de isoformas de CD44 (CD44v6 y CD44s) y relación con supervivencia

Tabla 49. Expresión de CD24 (citoplásmica y de membrana)

Tabla 50. CD24 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características

Tabla 51. ALDH1 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características

Tabla 53. Anticuerpos anti ALDH1 empleados reportados en los diversos estudios

Tabla 50. Anticuerpos anti Sox2 empleados reportados en los diversos estudios

Tabla 54. SOX2 y relación con supervivencia: estudios con valoración mediante IHQ y principales características

Tabla 55. Meta-análisis del significado clínico-patológico de CD133. Características y metodología de estudios incluidos

Tabla 56. Marcadores de células madre estudiados y asociación con supervivencia

Tabla 57. Grupos de riesgo combinando CD44v y CD24





ANEXOS

ANEXO I. HOJA DE RECOLECCIÓN DE VARIABLES

1. De identificación y clínicas

- a. Número de referencia en el estudio
- b. Fecha de nacimiento
- c. Sexo
- d. Historia de tabaquismo (años / paquete)
- e. Fecha de diagnóstico inicial
- f. Localización del tumor
- g. Modalidad de tratamiento quirúrgico: lobectomía o bilobectomía

2. Variables morfológicas convencionales:

- a. Tamaño tumoral
- b. Tipo histológico
- c. Estadio patológico
- d. Grado de diferenciación
- e. Invasión pleural
- f. Invasión vascular
- g. Necrosis
- h. Actividad proliferativa (mitosis / 10 cga)

3. Variables inmunohistoquímicas (IHQ):

- a. Marcadores IHQ de diferenciación histológica: expresión de p63/40, TTF1 y napsina
- b. Ki67
- c. p53
- d. CD44
- e. CD44v
- f. ALDH1
- g. CD133
- h. SOX2

4. Supervivencia

- a. Supervivencia global
- b. Supervivencia libre de enfermedad



Expresión de ALDH1 y CD133 en carcinoma pulmonar de célula no pequeña en estadios iniciales.

Toro Soto PA, Gálvez Muñoz C, Martín Serrano C, Rojas Calvente E, Aranda FI

Introducción. El estudio de biomarcadores en carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP) en la última década se ha centrado en la identificación de moléculas con capacidad pronóstica y predictiva que permitan estratificar mejor los pacientes y sirvan como guía en las decisiones terapéuticas. Por esto, el estudio de marcadores de células madre (CM) ha constituido un importante foco de atención. ALDH1 y CD133 han demostrado en estudios previos valor predictivo en tumores sólidos, sin que su papel en CPCNP sea del todo conocido.

Material y Métodos. Se seleccionaron 140 casos de CPCNP en estadios I y II sin afectación ganglionar, intervenidos quirúrgicamente. Se realizó estudio inmunohistoquímico sobre matrices de tejido (TMAs) con anticuerpos frente a CD133 y ALDH1 y se analizó su expresión en relación con variables clínicas y patológicas (ji cuadrado). Se realizó análisis de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) mediante curvas de Kaplan Meyer y test de log rank.

Resultados. 60% de casos correspondieron a adenocarcinomas (ACA), 34% a carcinomas de células escamosas (CCE) y 6% a carcinomas de célula grande (CCG). El 38% de casos fueron positivos para CD133 (punto de corte 10%) y 64% para ALDH1 (punto de corte 5%). Se observó asociación entre positividad para CD133 y género femenino, no tabaquismo, tipo histológico (ACA), mayor actividad mitótica y mayor expresión de Ki67 ($p < 0,05$). La positividad para ALDH se asoció con tipo histológico (CCE), mayor actividad mitótica y mayor Ki67 ($p < 0,05$). La mediana de seguimiento fue de 73 meses. Los pacientes ALDH1 positivos presentaron mayor SLE (117 vs 97 meses) (HR 0,55; IV 95% 0,313-0,995; $p = 0,044$) y tendencia a mayor SG (104 vs 91 meses) (HT 0,67; IC 95% 0,411-1,102; $p = 0,11$). Los pacientes CD133 positivos mostraron tendencia a menor SLE (100 vs 117 meses) (HR 1,68; IC 95% 0,937-3,020; $p = 0,07$), sin diferencias en la SG ($p = n.s$).

Conclusiones. Si la hipótesis de las CM demuestra ser correcta, la valoración de su expresión en CPCNP en estadios tempranos podría predecir el riesgo de recaída tras tratamiento quirúrgico. En este contexto, tumores positivos para ALDH1 presentan mayor SLE; en oposición, la positividad para CD133 se relaciona con tendencia a peor pronóstico. La posibilidad de valorar marcadores de CM mediante IHQ es una fortaleza que añade valor a los estudios en este campo.



Predictive value of CD44v/CD24 expression in early stages pulmonary adenocarcinomas

Toro Soto PA, Gálvez Muñoz C, Martín Serrano C, Rojas Calvente E, Aranda FI

Introduction. In the last decade the study of Cancer Stem Cell (CSCs) markers has become increasingly important in patients with solid tumors. This is of particular relevance in early stages NSCLC, where CD24 and CD44 have demonstrated promising results as prognostic markers. Previous studies suggested that the CD44⁺ / CD24⁻ phenotype defines a distinct subgroup of NSCLC. Here, we study the prognostic value of these 2 markers in early stage pulmonary adenocarcinomas (ADC).

Material and Methods. 83 pulmonary ADC (stages I and II, N0) were included. Using TMAs, IHC expression of CD44v and CD24 was studied (cut-off values $\geq 10\%$). Results were correlated with clinical and pathological information. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) estimates were determined from Kaplan-Meier analysis and compared using the log-rank test.

Results. 54% of cases were positive for CD44v and 46% for CD24. CD24 expression correlated with better DFS ($p= 0,021$), while positive CD44v cases exhibited a tendency for worse DFS ($p=0,11$). By combining this phenotype, the cohort was divided in 3 different prognostic groups: “good”, “intermedial” and “bad”, with DFS of 120, 93 and 55 months, respectively ($p= 0,007$).

Conclusions: Our findings show that the CD44⁺ / CD24⁻ phenotype allows the stratification of pulmonary ADC in prognostic subgroups. The possibility of using IHC as a means of predicting relapse risk in a subgroup of NSCLC in early stages is a very attractive option that deserves further investigation.