



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular  
(B16.56.1)

**Análisis comparativo de la utilidad diagnóstica de  
marcadores relacionados con la placa  
desmosomal en biopsias de carcinomas de  
pulmón de células no pequeñas**

**Inmaculada Galindo Ángel**

**Tesis Doctoral**

**Granada, 2022**

**Directoras:**

**Mercedes Gómez Morales**

**M<sup>a</sup> Esther Fárez Vidal**

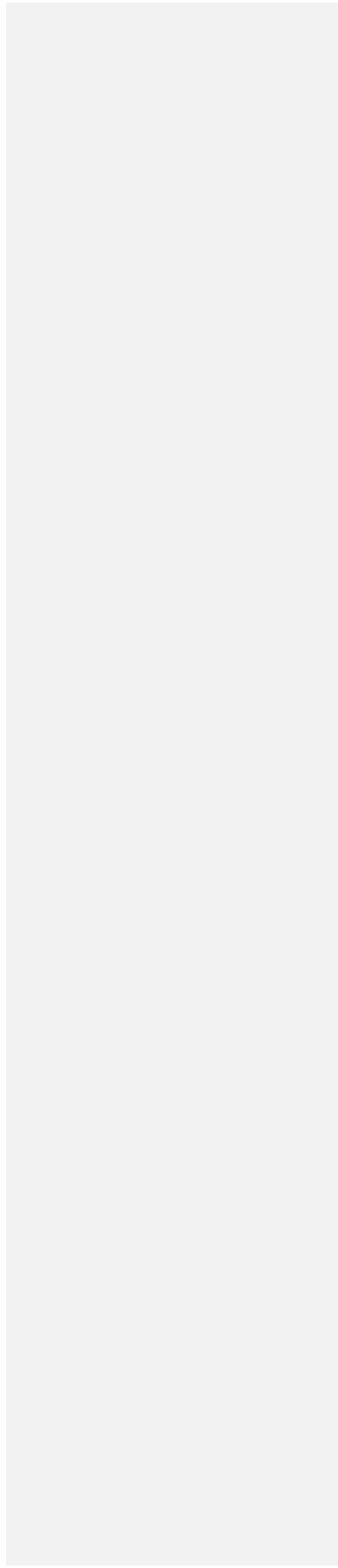
Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Inmaculada Galindo Ángel  
ISBN: 978-84-1117-684-2  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/80001>

## ÍNDICE

RESUMEN .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. CÁNCER Y CÁNCER DE PULMÓN COMO PROBLEMA DE SALUD .....	9
1.2. CÁNCER DE PULMÓN. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
1.2.1. Mortalidad .....	12
1.2.2. Supervivencia .....	12
1.2.3. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES .....	13
1.2.4. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES .....	14
1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES PULMONARES .....	16
1.3.1. TUMORES MALIGNOS EPITELIALES .....	18
1.3.2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS .....	20
1.3.3. ADENOCARCINOMA .....	22
1.4. CLASIFICACIÓN TNM EN CÁNCER DE PULMÓN. ESTADIFICACIÓN .....	24
1.5. PRUEBAS MOLECULARES .....	27
1.6. BIOLOGÍA DE LAS MUTACIONES ONCOGÉNICAS CONDUCTORAS.....	29
1.7. MUESTRAS DIAGNÓSTICAS PEQUEÑAS .....	31
1.8. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN .....	32
1.8.1. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS ...	32
1.9. UNIONES INTERCELULARES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA .....	37
1.9.1. DESMOSOMAS .....	40
1.10. PROTEÍNAS DE LA PLACA DESMOSÓMICA .....	42
1.10.1. PLACOFILINA 1 .....	42
1.10.1.1. PKP1 en enfermedades de la piel .....	46
1.10.1.2. PKP1 en cáncer.....	47
1.10.2. DESMOGLEINA 3 .....	48
1.10.2.1. Desmogleína 3 y cáncer .....	49
1.10.2.2. Desmogleína 3 y enfermedades de la piel .....	51
1.10.3. FILAMENTOS INTERMEDIOS .....	52
1.10.4. QUERATINAS .....	53
1.10.4.1. Queratinas Tipo I.....	56
1.10.4.2 Queratinas Tipo II.....	56
1.10.4.3. Funciones de las queratinas y enfermedades de las queratinas .....	58
1.10.5. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CÁNCER DE PULMÓN.....	59
1.10.5.1. p63-p40.....	59
1.10.5.1.1. Mecanismos de Regulación Transcripcional por p63 .....	62

1.10.5.1.2. $\Delta$ Np63 $\alpha$ es esencial para la morfogénesis normal y la homeostasis del epitelio escamoso .....	64
1.10.5.2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TIROIDEO 1 .....	67
1.10.5.2.1. Relación de TTF-1 con cáncer de pulmón .....	69
1.10.5.2.2. TTF-1 y la enfermedad del tiroides .....	70
1.10.5.3. NAPSINA A.....	70
1.10.5.3.1. Napsina A y Tumores de pulmón .....	71
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	74
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	79
2.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS .....	80
2.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	81
2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	83
2.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	84
2.5 MEDIDAS DE VALIDEZ EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	87
2.6 MEDIDAS DE FIABILIDAD EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	88
2.7 RAZONES DE VEROSIMILITUD O COCIENTE DE PROBABILIDAD (LR) (LIKELIHOOD RATIO) .....	88
2.8 ESTADÍSTICO J DE YOUTEN .....	89
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	89
3. RESULTADOS .....	91
3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	92
3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CONVENCIONALES.....	94
3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES PARA SCC.....	100
3.5 ANÁLISIS DE COMBINACIÓN DE MARCADORES.....	105
3.6 ANÁLISIS DE CURVAS ROC.....	107
3.7 MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE POR PASOS .....	110
3.8 EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES SCC EN RELACIÓN CON EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN.....	111
3.9 EXPRESIÓN DE MARCADORES EN RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ..	111
3.10 EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES SCC EN RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA .....	113
4. DISCUSIÓN .....	123
5. CONCLUSIONES .....	132
6. BIBLIOGRAFÍA.....	134

COPIA



RESUMEN

---

COPIA

El cáncer de pulmón tiene la incidencia más alta en los países en desarrollo donde el tabaquismo es más frecuente, con una variación de más de 20 veces en la incidencia entre regiones, además, es la principal causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo, sumando ambos sexos, y hombres y mujeres por separado. Representa por tanto un problema de salud mundial y de primera magnitud.

Está integrado por un grupo heterogéneo de tumores con características morfológicas, inmunohistoquímicas y genéticas diferentes. Antes de 2004 no tenía implicación terapéutica la distinción entre adenocarcinoma (AC) y carcinoma escamoso (SCC) y, con frecuencia, junto con el carcinoma indiferenciado de células grandes se agrupaban juntos, bajo la denominación de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (85% del total de diagnósticos) para distinguirlos del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) (15% del total de diagnósticos) cuyo abordaje terapéutico era diferente de inicio. En el año 2004 se comunica por primera vez la respuesta terapéutica de enfermos con AC y mutaciones del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) al tratamiento con inhibidores tirosina quinasa anti-EGFR y, desde este momento, se producen importantísimos avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón y en el desarrollo de terapias dirigidas a estas alteraciones moleculares, que han supuesto una mejora considerable en la supervivencia de estos enfermos. Por todo lo anterior, hoy en día, es absolutamente necesaria la distinción histológica precisa entre AC y SCC, así como el análisis de las alteraciones moleculares que pueden ser dianas terapéuticas.

Sin embargo, si se tiene en cuenta que el 70 % de los pacientes con cáncer de pulmón se diagnostican en estadio avanzado, no resecable, esta precisión diagnóstica hay que alcanzarla sobre biopsias pequeñas y especímenes citológicos, en los que hay además la necesidad de realizar estudios moleculares con finalidad terapéutica. Conseguir este objetivo puede ser un reto en muestras tumorales pequeñas de tumores de pulmón primarios o metastásicos obtenidos por aspiración con aguja fina (FNA) o de biopsias broncoscópicas muy pequeñas, en las cuales la clasificación precisa del tumor puede estar impedida por la existencia de escasas células viables y/o por ser tumores pobremente diferenciados. Existe en la actualidad un panel limitado de marcadores inmunohistoquímicos que ayudan a distinguir entre los diferentes tipos histológicos en NSCLC.

Es por todo ello, que se decidió valorar en este estudio nuevos marcadores inmunohistoquímicos, PKP1, KRT15 y DSG3 en cáncer de pulmón de células no pequeñas y determinar la tinción inmunohistoquímica tanto en núcleo como citoplasma y membrana para incorporar esas diferencias al diagnóstico

diferencial entre AC y SCC. De igual forma se ha hecho una valoración de los marcadores inmunohistoquímicos convencionales.

En el presente trabajo se pone de manifiesto que, en relación con la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos convencionales, entre los marcadores CK7, TTF1 y Napsina A, característicos de AC, y CK 5/6, p40 y p63, característicos de SCC, solo TTF1 en AC y p40 en SCC fueron específicos en  $\geq 94$  % de las muestras utilizadas en el estudio con  $\geq 94$  % de verdaderos positivos.

En el caso de los nuevos marcadores PKP1, KRT15 y DSG3, la tinción de membrana fue específica para  $\geq 94$  % de las muestras de SCC, con  $\geq 94$  % de verdaderos positivos en las muestras utilizadas en el estudio. En cuanto al panel de anticuerpos estudiado, la clasificación tanto de las muestras de AC como las de SCC fue más eficaz cuando los anticuerpos se aplicaron sucesivamente de forma escalonada. El modelo de regresión logística multivariante paso a paso determinó que la combinación de los marcadores CK5/6, p63 y PKP1 en la membrana dio un porcentaje de clasificación correcta del 94,6 % en muestras de AC y de 97,6 % en muestras de SCC. Se proponen dos paneles para el diagnóstico de SCC que proporcionan una especificidad del 100 %:

Panel 1- tinción positiva de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción negativa para TTF1; con un área bajo la curva (AUC) de 0,7619.

Panel 2- tinción positiva de membrana para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción negativa para TTF1 y Napsina A; con un área bajo la curva (AUC) de 0,7375.

Así mismo, se proponen dos paneles para el diagnóstico de AC que proporcionan una especificidad del 100 %:

Panel 1- tinción negativa de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción positiva para TTF1; con un área bajo la curva (AUC) de 0,8552.

Panel 2- tinción negativa de membrana para PKP 1, DSG3 y KRT15 y tinción positiva para TTF1 y Napsina A; con un área bajo la curva (AUC) de 0,8088.

En los estudios de supervivencia de los pacientes en relación con la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos, se establece la existencia de una relación entre niveles altos de ARN y proteína de PKP1 (y, en menor medida, DSG3) con una supervivencia general más prolongada para la cohorte de pacientes de la base de datos TCGA-LUSC (The Cancer Genome Atlas).

## 1. INTRODUCCIÓN

---

COPIA

## 1.1. CÁNCER Y CÁNCER DE PULMÓN COMO PROBLEMA DE SALUD

En el cáncer se producen alteraciones genéticas que dan lugar a la presencia de células anormales que presentan un crecimiento desregulado, constituyendo un proceso complejo, de múltiples etapas. Durante este proceso se produce una división celular incontrolada, acelerada y sin límite (la célula pierde la capacidad de muerte celular programada) y da como resultado la aparición de un tumor maligno. La proliferación constituye un proceso por el que se produce un aumento progresivo de las células tumorales. En este proceso, las células se van indiferenciando cada vez más y van adquiriendo cambios genéticos que aumentan su potencial de extensión local o locorregional y la infiltración de los microvasos linfáticos y sanguíneos, invasión de ganglios linfáticos y posterior colonización de otros órganos (metástasis a distancia) (Hanahan & Weinberg, 2011).

La interacción entre factores genéticos y agentes ambientales (carcinógenos externos químicos, físicos y biológicos), el envejecimiento y algunos hábitos de vida como el consumo de alcohol, el consumo de tabaco, la inactividad física y la alimentación poco saludable; son factores de riesgo importantes de padecer cáncer a nivel mundial (Stewart et al., 2014).

Con respecto a la biología del cáncer, mientras que las células normales maduran a un tipo de célula específico, las células cancerosas tienen un menor grado de especialización y permanecen en una etapa inmadura, evitando las señales anti-crecimiento, replicándose de forma descontrolada sin señales de factores de crecimiento y adquiriendo la capacidad de invadir los mismos tejidos o contiguos (lo que se conoce como metástasis y representa una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo (Massagué & Obenauf, 2016).

Las células tumorales no son genéticamente idénticas pero tienen un origen monoclonal, durante el desarrollo del tumor se producen una serie de transformaciones: mutaciones (alteraciones genéticas), competencia y selección celular (Greaves & Maley, 2012).

Las mutaciones que desencadenan los procesos que conducen al cáncer tienen lugar en tres tipos de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN.

- Protooncogenes. Dentro de este grupo se encuentra la familia RAS, C-Erb-B2 y Bcl-2. La mutación de estos genes normales crea oncogenes, la activación de los oncogenes suele ser por mutación, amplificación o reordenamiento como y como consecuencia las proteínas alteradas resultantes de la expresión de estos oncogenes, pueden estimular el crecimiento celular y/o la invasividad (Lee & Muller, 2010).
- Genes supresores de tumores. Dentro de este grupo se encuentra p53 y la proteína del retinoblastoma (RB). La función normal de estos genes es regular el ciclo celular, evitar la proliferación excesiva y promover una determinada localización celular. La inactivación de ambos alelos en estos genes puede causar proteínas aberrantes o pérdida de expresión, induciendo tumorigénesis. Estas inactivaciones bialélicas pueden ser causadas por mutación, metilación o pérdida de heterocigosidad (por pérdida de fragmentos cromosómicos o recombinación homóloga) (L.-H. Wang et al., 2018).
- Genes de reparación del ADN. Estos genes se encargan de rectificar errores por incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación del ADN, y reparar alteraciones inducidas por radiación y productos químicos. Las mutaciones en estos genes pueden inducir cáncer cuando dejan de poder reparar errores acumulados en protooncogenes y genes supresores de tumores (Carrassa & Damia, 2017).

## 1.2. CÁNCER DE PULMÓN. EPIDEMIOLOGÍA

Según las últimas estimaciones de GLOBOCAN, 2.094.000 nuevos casos de cáncer de pulmón fueron diagnosticados a nivel mundial en 2018, lo que convierte al cáncer de pulmón en el cáncer de mayor incidencia a nivel mundial. El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común en los hombres, después del cáncer de próstata, y el segundo cáncer más común en las mujeres, después del cáncer de mama (Figura 1.1) (Bray et al., 2018).

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages

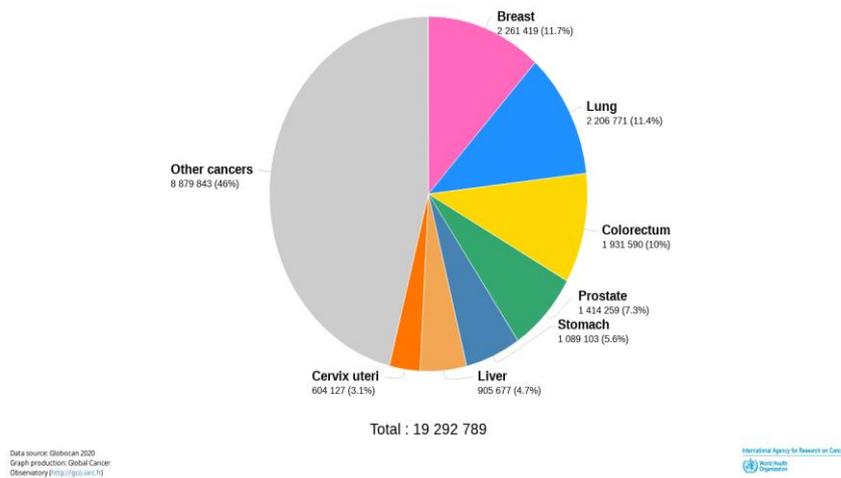


Figura 1.1. Incidencia en número de casos a nivel mundial en ambos sexos y todas las edades. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Available at: <https://gco.iarc.fr/today> (Accedido: 29.06.2022).

El cáncer de pulmón tiene la incidencia más alta en los países en desarrollo donde el tabaquismo es más frecuente, con una variación de más de 20 veces en la incidencia entre regiones. En Estados Unidos la incidencia actual ha bajado en gran parte debido a la disminución del tabaquismo, tendencia que se repite en otros muchos países occidentales. Mientras que en países como China y las naciones de la antigua Unión Soviética no se ha visto esta disminución en el número de casos (Figura 1.2) (Bray et al., 2018).

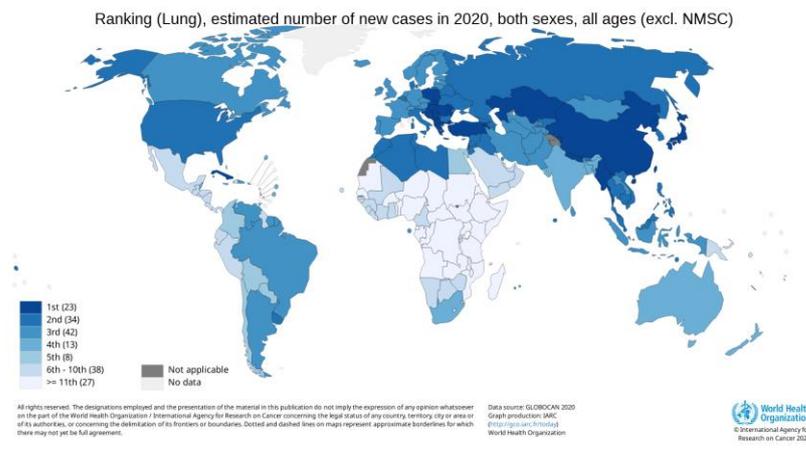


Figura 1.2. Incidencia en número de casos de cáncer de pulmón a nivel mundial en ambos sexos y todas las edades. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Available at: <https://gco.iarc.fr/today> (Accedido: 29.06.2022).

### 1.2.1. Mortalidad

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo, en ambos sexos y hombres y mujeres por separado. En 2018, el cáncer de pulmón representó el 18,4% de todas las muertes por cáncer en el mundo fue la principal causa de muerte entre los hombres en 93 naciones, incluidos EE. UU., Rusia y China (Bray et al., 2018) (Barta et al., 2019). El cáncer de pulmón fue la principal causa de muerte en mujeres en 28 naciones, incluidos EE. UU. y China (Bray et al., 2018). A diferencia de los hombres, la incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón entre las mujeres en los EE.UU. y Europa sigue aumentando. En 2017, el cáncer de pulmón superó al de mama como la principal causa muerte por cáncer entre las mujeres en Europa, con 14,6 muertes por 100.000 mujeres (Malvezzi et al., 2017).

### 1.2.2. Supervivencia

Según SEER (U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program), la tasa de supervivencia a 5 años para el cáncer de pulmón en los EE. UU. (de 2010 a 2016) fue del 20,5 %. El primer registro en la tasa de supervivencia a 5 años es de 1975 y fue del 11,5% (Bray et al., 2018). El aumento en la supervivencia es probable que se deba a una detección más temprana (p. ejemplo, examen de tomografía computarizada (TC) entre aquellos individuos con antecedentes significativos de tabaquismo), así como mejoras en las posibilidades de tratamiento con la introducción de terapias dirigidas

(inhibidores de EGFR, ALK, ROS y BRAF) y terapias inmunológicas (inhibidores de PD-1, PDL-1 y CTLA-4) (Barta et al., 2019).

### 1.2.3. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES

#### 1.2.3.1. *Edad*

La edad promedio para el diagnóstico de cáncer de pulmón en Estados Unidos fue 70 años entre hombres y mujeres. Se estima que el 53 % de los casos ocurren en personas de 55 a 74 años, mientras que el resto, el 37% ocurre en mayores de 75 años (Torre et al., 2016). El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en hombres mayores de 40 años y en mujeres mayores de 59 años en Estados Unidos (Siegel et al., 2020). La tumorigénesis en los pulmones parece ocurrir décadas después de la exposición inicial a los mutágenos, lo que explica el retraso en la evolución temporal de la enfermedad. El envejecimiento biológico también probablemente contribuye porque, con la edad, los telómeros se acortan, los niveles del metabolito NAD<sup>+</sup> disminuye y las células pierden la capacidad para resistir y reparar el daño del ADN, así como para vigilar células aberrantes (Siegel et al., 2020) (Campisi, 2013) (Shay, 2016). El cáncer de pulmón también se puede observar en adultos más jóvenes, menores de 55 años que representan el 10% de los casos en Estados Unidos. Los estudios de NSCLC en personas de 20 a 46 años de edad indican que los pacientes más jóvenes tienden a ser mujeres, no fumadores, y presentarse con un adenocarcinoma más avanzado, lo que sugiere un curso de la enfermedad más asociado con factores genéticos y menos asociado con mutágenos ambientales (Arnold et al., 2016).

#### 1.2.3.2. *Género*

A nivel mundial, los hombres tienen más del doble de probabilidades de ser diagnosticados y morir de, cáncer de pulmón. La disparidad de género se debe sobre todo a que hay mayor número de fumadores entre los hombres. En el mundo desarrollado, las tasas de incidencia están cayendo para el cáncer de pulmón en el caso de los hombres mientras que aumentan para las mujeres, esto parece ser debido a que las mujeres adoptaron más tarde el hábito tabáquico y también han tardado más tiempo en abandonar dicho hábito (Pesch et al., 2012). Si las mujeres son por naturaleza más susceptibles al cáncer de pulmón sigue siendo polémico. Hay una mayor tasa cáncer de pulmón en mujeres no fumadoras en comparación con hombres no fumadores, específicamente adenocarcinomas EGFR positivos (Subramanian & Govindan, 2007). También se ha sugerido que la influencia hormonal puede contribuir a esta diferencia pero es todavía objeto de estudio (Dougherty et al., 2006) (Kligerman & White, 2011) (Devesa et al., 2005). La mortalidad en Andalucía y España no ha dejado de aumentar desde 1980, tanto en varones como en mujeres. De los casos nuevos en el momento del diagnóstico tan sólo el 20% se encuentra en estadios

tempranos (estadios I y II de la clasificación TNM) y hasta el 40% de los casos tienen enfermedad diseminada (Cayuela et al., 2006).

#### 1.2.4. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES

##### 1.2.4.1 *Tabaco*

Más del 80% de los casos de cáncer de pulmón en los países occidentales son atribuibles al tabaquismo. El tabaquismo es considerado la principal causa prevenible de muerte en todo el mundo, principalmente debido al mayor riesgo de cáncer de pulmón (junto con neoplasias de vejiga, colorrectal, y otras) (Bray et al., 2018). La nicotina es el ingrediente adictivo en el tabaquismo que se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina en el cerebro, produce alteración de la expresión de genes y receptores y alteración en los niveles de neurotransmisores para fomentar la dependencia. La combustión del tabaco produce más de 60 carcinógenos conocidos, incluidos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y N-nitrosaminas. Estos compuestos inducen daño y mutaciones en el ADN que aumentan el riesgo de carcinogénesis décadas después de su uso. La exposición al humo del tabaco, en fumadores pasivos, también ha demostrado una relación dependiente de la dosis con el riesgo de cáncer de pulmón. Ciertos carcinógenos en el humo en los fumadores pasivos se inhalan en concentraciones más altas que en el caso del fumador debido a las filtros presentes en los cigarrillos (Wynder, 1950) (Jamal et al., 2018).

##### 1.2.4.2. *Amianto*

Se estima que la exposición ocupacional a carcinógenos representan del 5 al 10% de los casos de cáncer de pulmón en el mundo, de los cuales, el asbesto es el contribuyente más común (Devesa et al., 2005). El amianto es un mineral natural que se utiliza en la construcción debido a sus propiedades ignífugas. Se sabe que el asbesto deposita fibras en los pulmones y se ha asociado con variadas patologías pulmonares incluyendo neumoconiosis, cáncer de pulmón broncogénico y mesotelioma, una neoplasia rara de la pleura pulmonar (Singh et al., 2019) (Attanoos, 2010) (Nielsen et al., 2014) . La tasa de cáncer de pulmón entre los no fumadores en una cohorte norteamericana de aisladores (que trabajaba habitualmente con amianto) se incrementó 3,5 veces. También se sabe que las fibras de asbesto atrapan partículas de tabaco, lo que explica el efecto sinérgico del amianto con el tabaquismo en el cáncer de pulmón (Markowitz et al., 2013). Mientras que el uso de amianto está altamente regulado en el mundo occidental, la utilización de amianto está aumentando en países en desarrollo como Asia y América Latina (Kazan-Allen, 2005).

##### 1.2.4.3. *Radón*

El radón es un gas producido naturalmente a partir de la descomposición de uranio en el suelo, que tiene propiedades mutagénicas. La exposición al radón se

asocia con el tiempo que los individuos pasan bajo tierra, como en sótanos o minas, especialmente en regiones geográficas con alto contenido de uranio. Se sabe que los trabajadores de minas de metales o uranio tienen un riesgo notablemente mayor de desarrollar carcinoma de pulmón de células escamosas y en otros órganos (Roscoe et al., 1995) (Schubauer-Berigan et al., 2009). La exposición al radón es el segundo factor de riesgo más importante para la enfermedad pulmonar y presenta una sinergia con el tabaquismo, incrementando el riesgo de cáncer de pulmón (Krewski et al., 2006).

#### *1.2.4.4. Contaminación del aire*

Hay factores de riesgo para el cáncer de pulmón relacionados con la calidad del aire: carcinógenos de la combustión de combustibles fósiles, y partículas de materia suspendidas en el aire. Un estudio de las grandes ciudades en Estados Unidos determinó un aumento del 40 % en el riesgo de cáncer de pulmón en las 6 ciudades con mayores niveles de material particulado en el aire. La asociación con el cáncer fue mayor entre los individuos no fumadores (Alberg et al., 2013).

#### *1.2.4.5. Arsénico*

El arsénico es un metal pesado clasificado como carcinógeno del grupo 1 (carcinógeno para el ser humano) por la IARC (International Agency for Research on Cancer). La principal fuente de exposición son las fugas de arsénico inorgánico en aguas subterráneas; muchos trabajadores agrícolas y trabajadores industriales están expuestos a este metal (P. Liu et al., 2012). Según la IARC, el arsénico ha sido implicado en cánceres de piel, pulmón, vejiga, próstata, riñones y hígado en humanos (Q. Zhou & Xi, 2018). El arsénico también ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades vasculares, incluido el accidente cerebrovascular y cardiopatía isquémica (Palma-Lara et al., 2020). Estudios recientes también han sugerido secuelas diabéticas, neurológicas y reproductivas (Hong et al., 2014).

#### *1.2.4.6. Infección*

La inflamación y el daño celular durante las infecciones respiratorias se ha relacionado también con carcinogénesis pulmonar. La tuberculosis (TB), que es la principal causa infecciosa de muerte a nivel mundial, confirió una razón de probabilidad de desarrollo de cáncer de pulmón de 1,76 según un metanálisis (Brenner et al., 2011). La enfermedad por VIH también aumenta el riesgo de cáncer de pulmón hasta 2,5 veces, independientemente de si el individuo es o no fumador (Sigel et al., 2012) (D'Jaen et al., 2010). El mecanismo patogénico más probable es la inmunosupresión y deterioro de la vigilancia del cáncer. Los receptores de transplantes de órganos en terapias inmunosupresoras tienen tasas igualmente elevadas de cáncer de pulmón (Sigel et al., 2012) (D'Jaen et al., 2010). Por otro lado, las secuelas a largo plazo de la inflamación pulmonar, la liberación de una tormenta de citoquinas y dificultad respiratoria aguda

observada en los pacientes con COVID-19 pueden conferir un mayor riesgo de cáncer de pulmón décadas más adelante (Tay et al., 2020).

#### *1.2.4.7. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica*

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) principalmente ocurre debido al tabaquismo. La inflamación relacionada con la EPOC y la cicatrización se asocia independientemente con un aumento de riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Los mecanismos por los cuales la EPOC puede aumentar el riesgo de cáncer de pulmón incluyen aumentar el daño oxidativo que resulta en daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), exposición prolongada a citoquinas inflamatorias, supresión de los mecanismos de reparación del ADN, y aumento de la proliferación celular (Caramori et al., 2011). La EPOC es la enfermedad independiente con un factor de riesgo más común, distinto del tabaquismo, para el cáncer de pulmón, aumentando el riesgo de cáncer de pulmón entre 6 y 13 veces (Kuller et al., 1990) (Barreiro, 2008). La relación entre inflamación y cáncer no es exclusiva del pulmón, ya que la enfermedad inflamatoria crónica constituye un sustrato patológico que favorece el desarrollo de neoplasias en otros órganos. Por ejemplo, la pancreatitis crónica, la enfermedad inflamatoria intestinal y el esófago de Barret son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de páncreas, colon y esófago respectivamente (Barreiro, 2008).

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES PULMONARES

La última revisión que el panel de expertos de la OMS ha realizado sobre los tumores pulmonares se encuentra incluida en el libro de la OMS de tumores torácicos, publicado en 2021 (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021) (Tabla 1.1). La anterior clasificación del 2015 introdujo importantes cambios con respecto a las previas (1967, 1981, 1999 y 2004), principalmente como consecuencia del progreso en el conocimiento de la genética y de dianas moleculares con utilidad terapéutica. La inmunohistoquímica se introdujo por primera vez en la clasificación de la OMS en 1999 y en la de 2004 se limitaba su uso con finalidad diagnóstica a los carcinomas neuroendocrinos de células grandes, carcinomas sarcomatoides y en el diagnóstico diferencial con el mesoteloma maligno. El uso de la inmunohistoquímica y de estudios moleculares ha llevado a un diagnóstico más preciso desde el punto de vista patológico y genético, permitiendo la aplicación de estrategias terapéuticas mejores (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015)..

En la clasificación actual permanecen los principios de usar primero la morfología, apoyada por la inmunohistoquímica y después por técnicas moleculares. En la clasificación del 2015 se puso un especial énfasis en el uso de

la inmunohistoquímica para hacer el diagnóstico más preciso. En la clasificación del 2021 se hace más hincapié en los avances en la patología molecular para todos los tipos de tumores (Nicholson et al., 2022).

Determinadas anomalías moleculares individuales se utilizan como criterio diagnóstico para algunos tumores infrecuentes (por ejemplo, la fusión *EWSR1-CREB1* para el sarcoma mixoide pulmonar). Aunque muchas anomalías moleculares no se utilizan como criterio para la clasificación de subtipos específicos si que pueden afectar al tratamiento del enfermo (Nicholson et al., 2022).

<b>Epithelial tumours</b>	<b>Adenosquamous carcinomas</b>
<b>Papillomas</b>	8560/3 Adenosquamous carcinoma
8052/0 Squamous cell papilloma, NOS	
8053/0 Squamous cell papilloma, inverted	<b>Sarcomatoid carcinomas</b>
8260/0 Glandular papilloma	8022/3 Pleomorphic carcinoma
8560/0 Mixed squamous cell and glandular papilloma	8031/3 Giant cell carcinoma
	8032/3 Spindle cell carcinoma
<b>Adenomas</b>	8972/3 Pulmonary blastoma
8832/0 Sclerosing pneumocytoma	8980/3 Carcinosarcoma
8251/0 Alveolar adenoma	
8260/0 Papillary adenoma	<b>Other epithelial tumours</b>
8140/0 Bronchiolar adenoma / ciliated muconodular papillary tumour†	8023/3 NUT carcinoma
8470/0 Mucinous cystadenoma	8044/3 Thoracic SMARCA4-deficient undifferentiated tumour†
8480/0 Mucous gland adenoma	
<b>Precursor glandular lesions</b>	<b>Salivary gland-type tumours</b>
8250/0 Atypical adenomatous hyperplasia	8940/0 Pleomorphic adenoma
<b>Adenocarcinoma in situ</b>	8200/3 Adenoid cystic carcinoma
8250/2 Adenocarcinoma in situ, non-mucinous	8562/3 Epithelial-myoepithelial carcinoma
8253/2 Adenocarcinoma in situ, mucinous	8430/3 Mucoepidermoid carcinoma
	8310/3 Hyalinizing clear cell carcinoma†
<b>Adenocarcinomas</b>	8982/0 Myoepithelioma
<b>Minimally invasive adenocarcinoma</b>	8982/3 Myoepithelial carcinoma
8256/3 Minimally invasive adenocarcinoma, non-mucinous	<b>Lung neuroendocrine neoplasms</b>
8257/3 Minimally invasive adenocarcinoma, mucinous	<b>Precursor lesion</b>
<b>Invasive non-mucinous adenocarcinoma</b>	8040/0 Diffuse idiopathic neuroendocrine cell hyperplasia
8250/3 Lepidic adenocarcinoma	<b>Neuroendocrine tumours</b>
8551/3 Acinar adenocarcinoma	8240/3 Carcinoid tumour, NOS / neuroendocrine tumour, NOS
8260/3 Papillary adenocarcinoma	8240/3 Typical carcinoid / neuroendocrine tumour, grade 1
8265/3 Micropapillary adenocarcinoma	8249/3 Atypical carcinoid / neuroendocrine tumour, grade 2
8230/3 Solid adenocarcinoma	
8253/3 Invasive mucinous adenocarcinoma	<b>Neuroendocrine carcinomas</b>
8254/3 Mixed invasive mucinous and non-mucinous adenocarcinoma	8041/3 Small cell carcinoma
8480/3 Colloid adenocarcinoma	8045/3 Combined small cell carcinoma
8333/3 Fetal adenocarcinoma	8013/3 Large cell neuroendocrine carcinoma
8144/3 Adenocarcinoma, enteric-type	8013/3 Combined large cell neuroendocrine carcinoma
8140/3 Adenocarcinoma, NOS	
<b>Squamous precursor lesions</b>	<b>Tumours of ectopic tissues</b>
8070/2 Squamous cell carcinoma in situ	8720/3 Melanoma
8077/0 Mild squamous dysplasia	9530/0 Meningioma
8077/2 Moderate squamous dysplasia	
8077/2 Severe squamous dysplasia	<b>Mesenchymal tumours specific to the lung</b>
	8992/0 Pulmonary hamartoma
<b>Squamous cell carcinomas</b>	9220/0 Chondroma
8070/3 Squamous cell carcinoma, NOS	9170/3 Diffuse lymphangiomatosis†
8071/3 Squamous cell carcinoma, keratinizing	8973/3 Pleuropulmonary blastoma
8072/3 Squamous cell carcinoma, non-keratinizing	9137/3 Intimal sarcoma
8083/3 Basaloid squamous cell carcinoma	8827/1 Congenital peribronchial myofibroblastic tumour
8082/3 Lymphoepithelial carcinoma	8842/3 Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> fusion
<b>Large cell carcinomas</b>	<b>PEComatous tumours</b>
8012/3 Large cell carcinoma	9174/3* Lymphangioliomyomatosis
	8714/0 PEComa, benign
	8714/3 PEComa, malignant

Haematolymphoid tumours	
9699/3	MALT lymphoma
9680/3	Diffuse large B-cell lymphoma, NOS
9766/1	Lymphomatoid granulomatosis, NOS
9766/1	Lymphomatoid granulomatosis, grade 1
9766/1	Lymphomatoid granulomatosis, grade 2
9766/3	Lymphomatoid granulomatosis, grade 3
9712/3	Intravascular large B-cell lymphoma
9751/1	Langerhans cell histiocytosis
9749/3	Erdheim-Chester disease

Tabla 1.1. Clasificación de los tumores pulmonares de la OMS 2021 (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

Las principales novedades de la edición del 2021 sobre la del 2015 son:

- 1) Mayor énfasis en los estudios genéticos
- 2) Una sección totalmente dedicada a la clasificación de las muestras pequeñas
- 3) Recomendación de documentar los porcentajes de patrones histológicos en los adenocarcinomas no mucinosos invasivos y el uso de estas características en un sistema de gradación; usar sólo el tamaño de la porción invasiva, para el tamaño de T, en los adenocarcinomas no mucinosos, en parte lipídicos, como se recomienda en la octava edición de la clasificación TNM.
- 4) Reconocimiento de la diseminación a través de los espacios aéreos como una característica histológica con significado pronóstico.
- 5) El carcinoma linfoepitelial se incluye en los carcinomas escamosos.
- 6) Se actualizan los conceptos en evolución acerca de la clasificación de los tumores neuroendocrinos.
- 7) Reconocimiento del adenoma bronquiolar/tumor ciliado muconodular papilar como entidad nueva dentro del subgrupo de adenomas.
- 8) Reconocimiento del tumor indiferenciado torácico deficiente en SMARCA4.
- 9) Inclusión de criterios diagnósticos esenciales y deseables para cada tumor.

Nos centraremos en el análisis de las neoplasias malignas epiteliales y, dentro de ellas, en el adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas, que han sido objeto de nuestro estudio.

### 1.3.1. TUMORES MALIGNOS EPITELIALES

Constituyen un grupo heterogéneo con características clinicopatológicas muy variadas (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015). En sentido amplio, según las características morfológicas, inmunohistoquímicas y genéticas, los tumores

malignos epiteliales de pulmón se clasifican en dos grupos principales: carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (85% del total de diagnósticos) o carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) (15% del total de diagnósticos). Dentro de las clasificaciones de NSCLC, los adenocarcinomas son el subtipo más común de cáncer de pulmón (40 % del total de diagnósticos) , seguidos por los carcinomas de células escamosas (25 % de los diagnósticos), el carcinoma de células grandes representa el 10 % de los diagnósticos (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015) (Figura 1.3). La incidencia del carcinoma de células escamosas, que fue la histología más común, ha disminuido sustancialmente, en parte debido a reducciones en las tasas de tabaquismo en los países de ingresos altos y los cambios en la composición de los cigarrillos (Alberg et al., 2013).

Uno de los avances más importantes en los últimos años en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón es el concepto de medicina personalizada, en la que las decisiones terapéuticas se basan en las características histológicas y genéticas del tumor de cada enfermo. El descubrimiento de que las mutaciones de EGFR y ALK por ejemplo son dianas terapéuticas para los inhibidores de EGFR tirosin-quinasa y ALK y de que estas mutaciones se encuentran principalmente en AC, hace que la distinción entre los subtipos de NSCLC sea imperativo (Travis, Brambilla, Nicholson, et al., 2015).

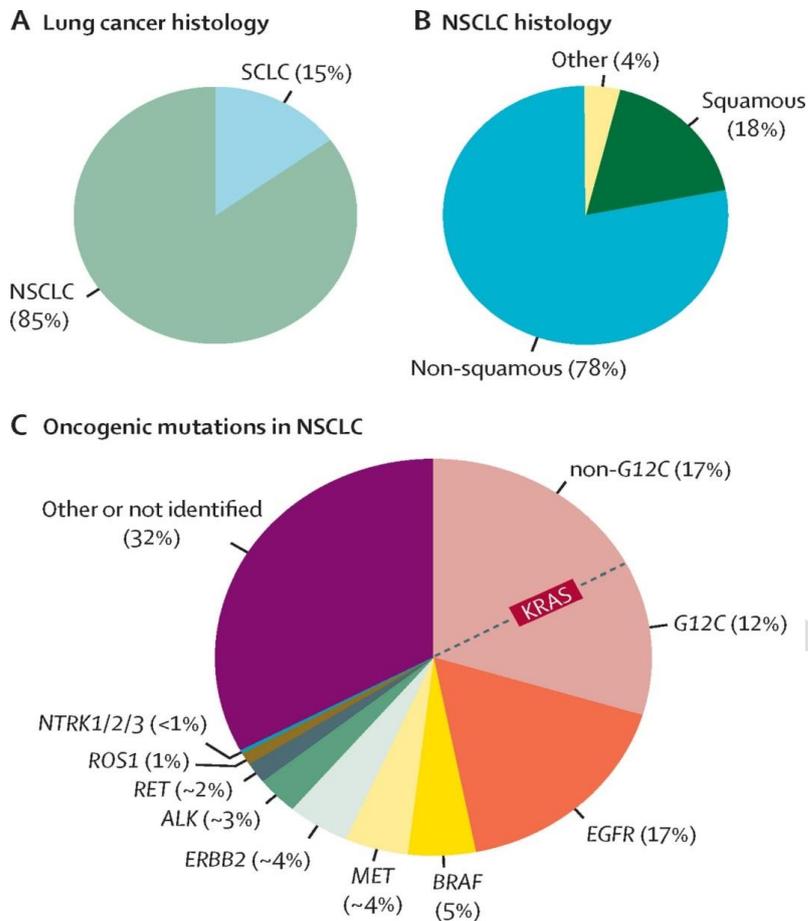


Figura 1.3. Histología en cáncer de pulmón. A) Clasificación histológica en cáncer de pulmón. B) Clasificación histológica en NSCLC. C) Mutaciones oncogénicas en NSCLC. (Adaptada de (Thai et al., 2021))

### 1.3.2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

La definición de la OMS para este tipo de tumor es la de un tumor maligno epitelial caracterizado por la presencia de queratinización, y puentes intercelulares o marcadores inmunohistoquímicos de diferenciación escamosa (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

Las células escamosas tumorales son de un tamaño grande con núcleos centrales hipercromáticos, uno o más nucléolos pequeños y un citoplasma abundante y pueden tener formas abigarradas (Roden et al., 2014).

Al menos dos terceras partes son de localización central y surgen en los bronquios principales o lobares. La localización periférica se da más en enfermos con enfermedad pulmonar intersticial (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

La displasia y el carcinoma escamoso in situ son lesiones preinvasivas precursoras del carcinoma escamoso. Surgen en el epitelio bronquial y forman parte de un continuo de cambios en el epitelio bronquial, asociado con la acumulación de alteraciones genéticas somáticas (Tabla 1.1) (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

Desde el punto de vista histológico se distinguen tres subtipos de carcinomas escamosos: queratinizante, no queratinizante y basaloide (Tabla 1.1), que presentan las mismas características que los carcinomas escamosos de otras localizaciones. El queratinizante presenta hechos morfológicos de queratinización (queratinización celular, perlas córneas o puentes intercelulares), que varían según el grado de diferenciación. El no queratinizante carece de estos hechos y para demostrar diferenciación escamosa se requiere confirmación inmunohistoquímica. El subtipo basaloide muestra arquitectura lobulillar con empalizada periférica y células de pequeñas a intermedias, sin morfología escamosa, pero con expresión inmunohistoquímica de marcadores escamosos. Todos estos subtipos pueden mostrar una serie de variaciones histológicas inusuales: morfología fusocelular, citología de células claras, así como patrón papilar, pseudovasculoso o de relleno alveolar (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

En la última revisión de la OMS (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021), como se ha comentado anteriormente, se incluye dentro de los carcinomas escamosos al carcinoma linfoepitelial. Se define como un carcinoma escamoso pobremente diferenciado con variable cantidad de infiltrado linfoplasmacítico y que frecuentemente se asocia al virus de Epstein-Barr.

El carcinoma de células escamosas se caracteriza inmunohistoquímicamente por queratinas de alto peso molecular (CK5/6, 34βE12) y antígeno carcinoembrionario (CEA). Es también pñositivo para p63, aunque su especificidad es limitada, dado que se expresa hasta en el 30% de los adenocarcinomas (Bota et al., 2001). El marcador que se considera más específico de diferenciación escamosa es p40. Aunque a veces puede haber positividad para algún marcador neuroendocrino sobre todo CD56, si hay positividad difusa para p40 el tumor se debe clasificar como escamoso (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

Ninguna alteración molecular relevante se ha descrito en este tipo de tumor. Aunque se ha descrito la presencia de mutaciones del gen epidermal growth factor receptor (EGFR) y translocaciones de *ALK* la frecuencia no suele ser superior al 1% (Travis et al., 2011) (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

### 1.3.3. ADENOCARCINOMA

A diferencia del carcinoma escamoso, suelen tener una localización periférica y la ocurrencia de síndromes paraneoplásicos es menos frecuente que en el carcinoma escamoso y carcinoma de células pequeñas. De acuerdo con el grado de invasión, los adenocarcinomas (AC) se dividen en AC in situ, AC mínimamente invasivos y AC invasivos. Según la producción de moco se clasifican como no mucinosos y mucinosos (Tabla 1.1). La hiperplasia adenomatosa atípica y el AC in situ se consideran lesiones precursoras de las formas invasivas.

La OMS define el AC in situ como un AC pequeño (menor o igual a 30mm), localizado y cuyo crecimiento está restringido a lo largo de estructuras alveolares preexistentes (patrón lepidico puro), sin características invasivas. El AC mínimamente invasivo sería igual al AC in situ, pero con presencia de invasión menor o igual a 5mm. Tanto el AC in situ como el mínimamente invasivo requieren para su diagnóstico la pieza de resección quirúrgica, ya que no pueden establecerse con certeza estos diagnósticos en biopsias pequeñas o citologías (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

La OMS define al AC invasivo no mucinoso como un NSCLC con evidencia morfológica o inmunohistoquímica de diferenciación glandular, presenta unas características histopatológicas heterogéneas (Kerr, 2012) y distintos patrones arquitecturales: lepidico, acinar, papilar, micropapilar y sólido. Estos diferentes patrones guardan relación con el grado de diferenciación y por tanto tienen valor pronóstico. Los bien diferenciados y de mejor pronóstico son los predominantemente lepidicos, los moderadamente diferenciados presentan un patrón acinar o papilar y los pobremente diferenciados tienen en más del 20% patrón sólido, micropapilar, cribiforme o glandular complejo (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

El AC mucinoso invasivo es un adenocarcinoma primario de pulmón con células tumorales, con morfología de células caliciformes o columnares, con abundante mucina intracitoplásmica. Es menos frecuente que los mucinosos (3-10 %).

Otros subtipos de adenocarcinomas son el coloide con lagos de moco extracelular, el fetal con una histología que semeja el pulmón fetal y el tipo entérico cuya morfología es semejante al adenocarcinoma colorectal (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

La inmunohistoquímica es útil para el diagnóstico diferencial entre AC de pulmón y adenocarcinomas metastásicos, para el diagnóstico de AC sólido (salvo que se demuestre moco intracelular) y, en muestras pequeñas, para hacer el diagnóstico de NSCC probablemente AC.

No hay marcadores con 100% de sensibilidad o especificidad, pero los marcadores de neumocitos TTF1 y Napsina A son positivos en la mayoría de los casos (75-80%). Los AC mucinosos suelen ser negativos para TTF1 y Napsina A. En algunos de estos tumores la pérdida de expresión de TTF1 puede estar motivada por mutaciones conductoras en *NKX2-1*, cuyo producto proteico es TTF-1. De igual forma el AC de tipo entérico es negativo para TTF1 en más de la mitad de los casos. Cuando se utiliza un panel limitado es preferible el uso de TTF1 que de Napsina A. Puede haber a veces positividad simultánea para TTF1 y p40 que suele corresponder a un AC con esta doble expresión, pero hay que considerar la posibilidad de un carcinoma adenoescamoso. Cuando se valora TTF1 siempre hay que excluir la posibilidad de que las células positivas sean células nativas atrapadas. Hay que considerar también que TTF1 es positivo además en los tumores de tiroides, en carcinomas neuroendocrinos de células pequeñas pulmonares y extrapulmonares y en algunos tumores del tracto genital femenino. La Napsina A también puede expresarse en tumores de otro origen como el carcinoma renal de células claras (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021) (ver más adelante).

En el AC de pulmón se dan una serie de mutaciones oncogénicas conductoras que afectan a los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1-3*, *MET*, *ERBB2 (HER2)*, *MAP2K1*, *NRAS* y *NRG1*. En la actualidad se dispone de terapia dirigida para enfermos cuyos tumores albergen mutaciones en los genes *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET* y familia *NTRK* (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021). Por ello, el estudio de estas mutaciones es crucial para orientar la terapia en cada enfermo.

A diferencia de las alteraciones genéticas de otros tumores como linfomas, leucemias y sarcomas no hay una correlación histológica/molecular en cáncer de pulmón, aunque hay asociaciones estadísticas entre determinadas mutaciones y ciertos patrones histológicos. Por ejemplo, la mutación *EGFR* es más frecuente en el AC no mucinoso con patrón lepidico (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021).

Las mutaciones de *EGFR* y *ERBB2* y las fusiones de *ALK*, *ROS1*, *RET* y familia *NTRK* se dan más en AC que son TTF1 positivos y en tumores de enfermos que nunca han fumado. La mutación de *EGFR* es también más frecuente en mujeres y en poblaciones del este asiático; las mutaciones de *KRAS*, *NRAS* y *MAP2K1 (MEK1)* son más prevalentes en fumadores y las de *BRAF* y *MET* ocurren tanto en fumadores como no fumadores (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021). Dos terceras partes de los AC pulmonares tienen una mutación oncogénica o una fusión en alguno de los genes mencionados anteriormente, todos los cuales están implicados en la vía de señalización *RAS/MAPK*.

Las mutaciones más frecuentes y que se asocian a sensibilidad al tratamiento con inhibidores de la tirosin-quinasa anti *EGFR* afectan al exón 19. La mayoría de los enfermos con mutación de *EGFR* que reciben tratamiento con estos inhibidores progresan y el mecanismo molecular más frecuente de su resistencia al tratamiento es la mutación *EGFR T790M* que aparece en el 50-60% de los casos (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021) (Conde E, Hernández S, Gómez-Román J, López-Ríos F, 2021)

Como se ha comentado anteriormente, en el apartado del carcinoma escamoso, este tumor puede tener también mutaciones de *EGFR* y translocaciones de *ALK* pero con baja frecuencia (Travis et al., 2011). De igual forma, La mutación *EGFR* se ha descrito en carcinoma de células grandes pero no en carcinoma de células grandes de tipo neuroendocrino (Leiro-Fernández et al., 2014)-

#### 1.4. CLASIFICACIÓN TNM EN CÁNCER DE PULMÓN. ESTADIFICACIÓN

La Asociación Internacional Para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) ha desarrollado una nueva base de datos con 94,708 casos, provenientes de 35 fuentes y 16 países de todo el mundo (Rami-Porta et al., 2014) (Eberhardt et al., 2015) (Travis et al., 2016). Fruto del análisis de los datos recogidos, nace la última propuesta de clasificación TNM para el Cáncer de Pulmón, que fue publicada a finales de 2016 (Goldstraw et al., 2016) y adoptada por la UICC (Union for International Cancer Control) en la octava edición de la clasificación TNM (Brierley et al., 2017).

En el sistema TNM se establecen tres descriptores:

- Descriptor T: Extensión del tumor primario  
Dentro de este descriptor se establece:

- Tx: El tumor primario no puede ser evaluado o tumor evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no evidenciado en pruebas de imagen o broncoscopia
  - T0: Ninguna evidencia de tumor primario.
  - Tis: Carcinoma `` in situ``.
  - T1: Tumor  $\leq$  de 3 cms en su dimensión mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia mediante broncoscopia de invasión más proximal que el bronquio lobar.
    - T1a (mi): Adenocarcinoma mínimamente invasivo. Adenocarcinoma solitario de 3 cm o menos con un predominante componente lepidico y 5 mm o menos de invasión en cualquier foco
    - T1a: Tumor  $\leq$  1 cms en su dimensión mayor.
    - T1b: Tumor  $>$  1 cms, pero  $\leq$  de 2 cms en su dimensión mayor.
    - T1c: Tumor  $>$  2 cms, pero  $\leq$  de 3 cms en su dimensión mayor.
  - T2: Tumor  $>$  de 3 cms pero  $\leq$  a 5 cms en su dimensión mayor o tumor con alguna de las siguientes características:
    - Afecta bronquio principal independientemente de la distancia desde carina pero sin afectación carinal.
    - Invade pleura visceral.
    - Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, afectando a parte o todo el pulmón. Los tumores con estas características se catalogan como T2a si son de 4 cm o menos o si el tamaño no puede determinarse y T2b si son mayores de 4 cm pero no mayores de 5 cm.
  - T2a: Tumor  $>$  de 3 cms pero  $\leq$  de 4 cms en su dimensión mayor.
  - T2b: Tumor  $>$  4 cms pero  $\leq$  de 5 cms en su dimensión mayor.
  - T3: Tumor  $>$  de 5 cms pero  $\leq$  de 7 cms o que invade directamente alguna de las siguientes estructuras: pleura parietal, pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal; o nódulo (s) tumorales en el mismo lóbulo que el primario.
  - T4: Tumor  $>$  7 cm en su diámetro mayor o cualquier tamaño con invasión de alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina; o asociado a nódulos tumorales, en distinto lóbulo, ipsilateral al del tumor primario.
- Descriptor N: Afectación de ganglios linfáticos regionales.  
Dentro de este descriptor se establece:
- Nx: No pueden ser evaluados los ganglios linfáticos regionales.

- N0: No existen ganglios linfáticos regionales afectados.
- N1: Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hiliares e intrapulmonares ipsilaterales. Incluyendo afectación por extensión directa.
- N2: Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
- N3: Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.

➤ Descriptor M: Metástasis a distancia.

Dentro de este descriptor se establece:

- M0: No metástasis a distancia
- M1: Existen metástasis a distancia
  - M1a: Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico malignos (La mayoría de los derrames pleurales (pericárdicos) con Cáncer de Pulmón son debidos al tumor. En pocos pacientes, sin embargo, múltiples exámenes del líquido pleural (pericárdico) son negativos para células neoplásicas y el líquido no es hemático ni un exudado. Cuando estos aspectos y el juicio clínico concluyen que el derrame no se relaciona con el tumor, el derrame debería ser excluido como descriptor de estadificación).
  - M1b: Metástasis única extratorácica (esto incluye la afectación de un único ganglio no regional).
  - M1c: Metástasis múltiples extratorácicas en uno o varios órganos.

Según la clasificación TNM se establecen los siguientes estadios:

Carcinoma oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IA1	T1mi	N0	M0
	T1a	N0	M0
Estadio IA2	T1b	N0	M0
Estadio IA3	T1c	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T1a-c,T2a,b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1a-c,T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
Estadio IIIB	T1a-c,T2a,b	N3	M0
	T3,T4	N2	M0
Estadio IIIC	T3,T4	N3	M0
Estadio IV	cualquier T	cualquier N	M1
Estadio IVA	cualquier T	cualquier N	M1a,b
Estadio IVB	cualquier T	cualquier N	M1c

## 1.5. PRUEBAS MOLECULARES

Las pautas actuales (p. ej., Colegio de Patólogos Estadounidenses, Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón y la Asociación de Patología Molecular) recomiendan que todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón avanzado con diagnóstico reciente se sometan a pruebas para mutaciones de EGFR; reordenamientos de ALK y ROS-1; BRAF Val600Glu (BRAfV600E); reordenamientos de RET; y mutaciones de omisión del exón 14 de MET (Kalemkerian et al., 2018) (Lindeman et al., 2018). Sin embargo, a la luz de los nuevos fármacos aprobados se recomiendan pruebas moleculares más amplias, que incluyan otras alteraciones susceptibles de tratamiento, como fusiones de NTRK, sobreexpresión de HER-2 y mutaciones de HER-2 (Lindeman et al., 2018). Históricamente, se pensaba que las mutaciones conductoras en NSCLC ocurrían en pacientes con histología de adenocarcinoma y antecedentes

de tabaquismo leve o no fumador (Shaw et al., 2009) (Bergethon et al., 2012); sin embargo, las mutaciones conductoras se pueden encontrar en todas las histologías, edades y antecedentes de tabaquismo. Los casos NSCLC BRAF positivos,, MET amplificados y KRAS positivos se encuentran en mayor proporción en fumadores que en no fumadores (Marchetti et al., 2011) (Cardarella et al., 2013).

Se recomiendan las pruebas multiplex con secuenciación de última generación para las pruebas moleculares, ya que este proceso anula la necesidad de múltiples pruebas cuando puede haber poca disponibilidad de tejido (Lindeman et al., 2018). Se pueden usar ensayos de un solo gen para alteraciones genéticas específicas, pero a menudo se realizan secuencialmente, lo que retrasa el tiempo de tratamiento.

Las recomendaciones generales de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) para la determinación de biomarcadores moleculares e inmunes en los NSCLC son semejantes y se especifican a continuación (Conde E, Hernández S, Gómez-Román J, López-Ríos F, 2021):

- Las mutaciones de EGFR, reordenamientos de *ALK* y *ROS 1* así como las mutaciones de Braf se deben realizar en todos los pacientes en estadio avanzado con el diagnóstico de AC o cuando este no se pueda excluir. También en enfermos con otros tumores, por ejemplo, SCC cuando clínicamente se sospeche la probabilidad de albergar una alteración molecular (por ejemplo, no fumadores, enfermos jóvenes).

- La determinación de otros marcadores moleculares (*MET*, *RET*, *HER2* y *KRAS*) no se recomienda con pruebas independientes, pero se recomienda su estudio mediante secuenciación masiva dirigida (NGS next-generation sequencing) de forma semejante a las recomendaciones de otras sociedades médicas, como se ha comentado antes. Esto se debe hacer tanto de forma inicial como cuando los resultados de los estudios de *ALK/ROS1/EGFR/BRAF* sean negativos.

- En pacientes con mutaciones *EGFR* que han progresado tras el tratamiento con inhibidores tirosina-quinasa anti *EGFR*, se recomienda el análisis de la mutación de resistencia *EGFR T790M*.

- Con respecto a los biomarcadores de respuesta inmune (ver más adelante en el apartado de tratamiento), actualmente es obligatoria la determinación de la expresión inmunohistoquímica de PDL1 en todos los pacientes con NSCLC avanzado y muy probablemente esto se extienda también a aquellos con enfermedad avanzada localmente.

El estudio de biomarcadores se puede llevar a cabo, además de en material en parafina procedente de biopsias o de bloques celulares de citologías, en extensiones citológicas, siempre que tengan un número suficiente de células.

Un tipo de muestra recientemente incorporada es la biopsia líquida procedente de sangre (plasma), orina, líquido pleural, saliva etc. De ellas se pueden obtener células tumorales, ADN libre circulante, ADN circulante tumoral, exosomas circulantes, ARN plaquetario y ARN circulante tumoral. El número de falsos negativos es alto por lo que cuando el resultado es negativo se recomienda recurrir a las muestras convencionales si es posible (Conde E, Hernández S, Gómez-Román J, López-Rios F, 2021).

## 1.6. BIOLOGÍA DE LAS MUTACIONES ONCOGÉNICAS CONDUCTORAS

Las mutaciones conductoras somáticas en EGFR fueron las primeras descubiertas en NSCLC y confieren sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) (Lynch et al., 2004) (Paez et al., 2004). Fundamentalmente, los cánceres de pulmón impulsados por oncogenes siguen marcos biológicos comunes. Alteraciones conductoras oncogénicas: dan como resultado la activación constitutiva de las vías de señalización de las quinasas que normalmente requieren una activación dependiente del ligando, como se refleja en la Figura 1.4A (J. Zhang et al., 2009); parecen ser eventos clonales tempranos en la evolución del tumor y se mantienen en todos los subclones que se desarrollan durante la progresión del tumor, suelen ser mutuamente excluyentes de otras mutaciones conductoras, y conducen a la llamada adicción al oncogén siendo las células cancerosas dependientes de la vía de señalización activada para sobrevivir (Govindan et al., 2012) (Toyooka et al., 2006). Estas características constituyen la base para el uso dirigido de TKI contra estas mutaciones oncogénicas conductoras.

A pesar del éxito de las terapias dirigidas, inevitablemente se produce resistencia (Figura 1.4B) (Bivona & Doebele, 2016). La resistencia adquirida se puede clasificar en tres categorías reflejadas en la Figura 1.4C. La resistencia en la diana describe alteraciones en el gen diana, que pueden incluir la amplificación del gen diana o mutaciones en un segundo sitio que interfieren con la unión del fármaco. La resistencia fuera de la diana a menudo ocurre a través de la reactivación de vías de señalización oncogénicas aguas abajo del gen diana, a pesar de la inhibición continua de la quinasa diana (Garraway & Jänne, 2012) (Rotow & Bivona, 2017) (Sequist et al., 2011). La tercera categoría es la transformación fenotípica, en la que las biopsias realizadas en los pacientes durante la progresión de la enfermedad con terapias dirigidas han mostrado una

transformación de NSCLC a SCLC (Garraway & Jänne, 2012) (Rotow & Bivona, 2017) (Sequist et al., 2011) (Niederst et al., 2015) (Kim et al., 2013).

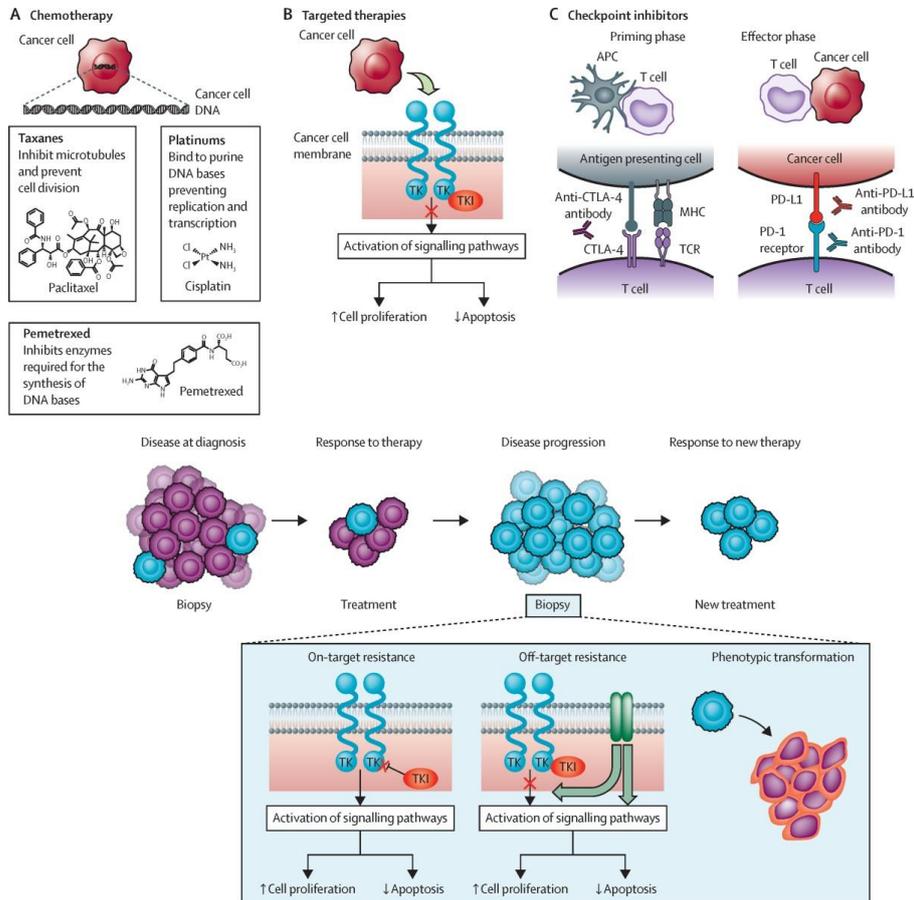


Figura 1.4. Mecanismos de terapias anticancerígenas y evolución de la resistencia a terapias dirigidas. A) Se muestran los mecanismos de acción generalizados de los agentes citotóxicos, los inhibidores de la tirosina quinasa y los inhibidores del punto de control inmunitario. B) Después de la respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa, inevitablemente se desarrolla la resistencia a los fármacos. C) La biopsia en el momento de la progresión puede identificar el mecanismo de resistencia dominante y guiar la decisión terapéutica posterior. (Adaptada de (Thai et al., 2021)

## 1.7. MUESTRAS DIAGNÓSTICAS PEQUEÑAS

Para el 70 % de los pacientes que presentan la enfermedad en estado avanzado, no resecable, el diagnóstico debe ser primariamente sobre biopsias pequeñas y especímenes citológicos. Una clasificación histológica precisa (y en muchos casos pruebas moleculares y/o de biomarcadores) del cáncer de pulmón es esencial porque el clínico necesita establecer terapias sistémicas acordes con el tipo histológico, así como acorde al perfil molecular y/o de biomarcadores.

Como ya se ha comentado con anterioridad, en los últimos 15 años, los éxitos terapéuticos más destacados incluyen los inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR para tumores con mutaciones de EGFR; inhibidores de ALK, ROS1, BRAF, RET y NTRK y la reciente adición de inhibidores de la vía del punto de control inmunitario, ya sea en el tratamiento de segunda línea o de primera línea del NSCLC (Travis, Brambilla, Nicholson, et al., 2015) (Planchard et al., 2019). (Reck et al., 2016).

Por esta necesidad de establecer un diagnóstico preciso en estas muestras, en la clasificación de los AC de pulmón de la IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society) de 2011 se introdujo una clasificación para muestras pequeñas, que fue adoptada posteriormente por la OMS en su clasificación del 2015 (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2015) (WHO 2015). En la última revisión de los tumores pulmonares de la OMS de 2021 (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021) se dedica un capítulo al diagnóstico de muestras pequeñas.

De forma resumida, las recomendaciones generales, con respecto a los carcinomas escamosos y adenocarcinomas son:

- Siempre que sea posible hay que clasificar a los tumores en un tipo específico evitando el uso del término NSCLC NOS.
- Debe establecerse si el diagnóstico se hace en base a la histología sólo o con la ayuda de técnicas especiales.
- Si existe citología y biopsia deben examinarse en conjunto para conseguir un diagnóstico concordante.
- Los términos AC in situ y AC mínimamente invasivo no pueden usarse en muestras pequeñas; en este caso deben referirse como patrón lepidico.
- No debe usarse el término carcinoma de células grandes en muestras pequeñas. Se usará sólo en piezas quirúrgicas, una vez muestreadas extensamente, para descartar componente diferenciado.

Si hay morfología clara de SC o AC se diagnostican como tales. Si no hay características morfológicas claras a favor de uno u otro, se diagnostica como NSCLC a favor de carcinoma escamoso si es positivo para p40 y si expresa TTF1 como NSCLC a favor de AC,

-Si hay características sarcomatoides, se procede como se comenta en el párrafo anterior y sólo si p40 y TTF1 son negativos se denominará NSCLC NOS con un comentario sobre la presencia de áreas sarcomatoides.

-Se realizarán marcadores neuroendocrinos sólo en casos en que por la morfología se sospeche esta diferenciación.

## **1.8. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN**

El tratamiento del cáncer de pulmón depende del tipo, ubicación, tamaño, estadio tumoral y la extensión de la enfermedad y, también por supuesto, depende del estado de salud general del paciente. Existen también ensayos clínicos que se ponen en marcha con el fin de investigar nuevos tratamientos y en los que pueden participar los pacientes previamente informados de las características del ensayo.

### **1.8.1. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS**

Se tratará en este apartado tanto del tratamiento convencional como de los nuevos tratamientos en NSCLC.

#### **1.8.1.1. TRATAMIENTO CONVENCIONAL**

El tratamiento convencional del NSCLC incluye la cirugía, quimioterapia y radioterapia. La cirugía es el tratamiento de preferencia para extirpar tumores NSCLC en estadio I y II. Además, la cirugía también se puede utilizar para extirpar tumores que causan dolor o presión, e incluso para ayudar a que otros tratamientos funcionen mejor (Howington et al., 2013). En términos generales la cirugía está indicada cuando la resección puede ser completa, o cuando el residuo sea microscópico o adenopático pero no macroscópico. La quimioterapia (QT) y radioterapia (RT) son también pilares fundamentales del tratamiento. En enfermos con estadio II y III se recomienda QT adyuvante o postquirúrgica

siempre que la resección haya sido completa y el paciente esté recuperado de la cirugía. En pacientes con resección incompleta se recomienda QT y RT. En enfermos con estadio III o enfermedad localmente avanzada no hay una recomendación única y se requiere de un equipo multidisciplinar que examine las distintas opciones terapéuticas. La QT siempre ha sido el tratamiento de elección para enfermos en estadio IV (Ramalingam & Belani, 2008) (Amini et al., 2014). En la actualidad con el descubrimiento de alteraciones moleculares con valor terapéutico (como se ha comentado anteriormente en esta introducción), ha cambiado el esquema de tratamiento de estos enfermos. A continuación, se incluye una tabla (Tabla 1.2), con las recomendaciones terapéuticas de la SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica), de acuerdo al estadio (Villar Álvarez et al., 2016).

La quimioterapia adyuvante después de la extirpación del tumor puede prevenir la reaparición del cáncer, principalmente para pacientes en estadio II y IIIA («Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer», 1995) (grupo colaborativo, 1995). Así, se recomienda una combinación de tratamientos de quimioterapia y radioterapia a aquellos pacientes con tumores de pulmón en estadio III que no se pueden extirpar mediante cirugía.

En muchos pacientes con cáncer de pulmón se utiliza el tratamiento con quimioterapia antes de la radioterapia o la cirugía para facilitar la posterior extirpación del tumor o para aumentar la eficacia de la radiación.

La quimioterapia de primera línea incluye dos fármacos: uno de ellos está basado en platino (cisplatino, carboplatino) y el otro fármaco que se administra (gemcitabina, docetaxel, pemetrexed, paclitaxel y vinorelbina) (Masters et al., 2015) debe seleccionarse en función de si el tumor es escamoso o no (Villar Álvarez et al., 2016) ya que se obtienen mejores resultados con pemetrexed en tumores no escamosos y de igual forma el uso de bevacizumab asociado a QT es recomendable sólo en pacientes con histología no escamosa.

Aunque la quimioterapia y la radioterapia han demostrado su eficacia en la lucha contra cáncer de pulmón, se deben lograr mejoras en la mortalidad y morbilidad de los pacientes. Estos tratamientos no pueden discriminar entre células normales y células cancerosas y, frecuentemente causan un alto número de efectos secundarios.

Estadio	TNM	Tratamiento inicial
IA	T1AN0M0; T1BN0M0	Resección quirúrgica RT en pacientes no candidatos a cirugía <sup>a</sup>
IB	T2aN0M0	Resección quirúrgica RT en pacientes no candidatos a cirugía <sup>a</sup>
IIA	T2bN0M0; T1a-bN1M0; T2aN1M0	Resección quirúrgica RT ± QT en casos seleccionados <sup>a</sup>
IIB	T2bN1M0; T3N0M0	Resección quirúrgica RT ± QT en casos seleccionados <sup>a</sup>
IIB	T3N0M0 (sulcus superior)	QT + RT concurrente neoadyuvante y cirugía <sup>b</sup>
IIIA	T3N1M0; T4N0-1M0	Resección quirúrgica QT ± RT neoadyuvante <sup>a</sup> y cirugía <sup>b</sup> (T4 seleccionados)
IIIA	T1-3N2M0	QT neoadyuvante y cirugía <sup>b</sup> QT + RT neoadyuvante y cirugía <sup>b</sup> en casos seleccionados
IIIB	T4N2M0	QT + RT radical QT + RT neoadyuvante y cirugía <sup>b</sup> en casos seleccionados
IIIB	T1-4N3M0	QT + RT radical
IV	T1-4N0-3M1a-b	QT paliativa/terapias dirigidas Cirugía y/o RT en casos seleccionados

QT: quimioterapia; RT: radioterapia.

<sup>a</sup>Pacientes inoperables.

<sup>b</sup>Cirugía en función de la respuesta al tratamiento quimiorradioterápico.

Tabla 1.2. Recomendaciones de la SEPAR para el tratamiento del NSCLC, de acuerdo al estadio. Tomado de (Villar Álvarez et al., 2016).

### 1.8.1.2. NUEVAS TERAPIAS EN EL TRATAMIENTO NSCLC

Como se ha comentado anteriormente en esta introducción, en el cáncer de pulmón se ha producido un avance en el tratamiento con la introducción de terapias dirigidas, diseñadas específicamente para atacar las células cancerosas aprovechando las mutaciones genómicas generadas en estas células y que

ayudan a las células cancerosas a obtener una ventaja respecto de la proliferación celular. Se utilizan biomarcadores moleculares que indican la posibilidad de tratamiento del paciente con un fármaco o combinación de fármacos, incluso pacientes en estadios avanzados (Tsimberidou, 2015).

La mayoría de las terapias dirigidas son moléculas pequeñas (utilizados para objetivos que están dentro de las células) o anticuerpos monoclonales (contra objetivos específicos en la superficie externa de las células cancerosas). Con respecto al cáncer de pulmón de células no pequeñas, estos tratamientos incluyen: Erlotinib, Afatinib y Gefitinib para mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yamaoka et al., 2017); Bevacizumab, que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Russo et al., 2017); y Crizotinib y Ceritinib, que bloquean el receptor ALK tirosina quinasa (Gainor et al., 2015).

Sin embargo, es crucial incrementar la investigación en este nuevo campo ya que muchas veces los pacientes con cáncer de pulmón pueden desarrollar resistencia al tratamiento dirigido debido a los continuos cambios mutacionales que sufren las células cancerosas (Pakkala & Ramalingam, 2018).

La inmunoterapia ha surgido recientemente como un tratamiento prometedor contra el cáncer de pulmón. Esta terapia biológica ayuda al sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer a través de estrategias diferentes y con pocos efectos secundarios. Los nuevos tratamientos de inmunoterapia para NSCLC y SCLC están revolucionando la terapia actual contra el cáncer.

El sistema inmunitario consta de varios tipos de células, moléculas y órganos que tienen como misión proteger el cuerpo de infecciones y enfermedades. El sistema inmunológico se clasifica clásicamente en dos categorías: el sistema inmunitario innato, que proporciona la primera barrera de defensa, y el sistema inmunitario adaptativo, que incluye a aquellos miembros del sistema inmunitario que pueden recordar los antígenos invasores, y que permite una reacción más rápida en una subsiguiente interacción.

La inmunooncología es un campo de investigación emergente y prometedor en el tratamiento del cáncer y se centra en tratar de encontrar formas de estimular los componentes del propio sistema inmunitario o potenciar el sistema inmunológico mediante la adición de componentes externos para combatir mejor las células tumorales (Finn, 2012). La inmunoterapia se dirige al sistema inmunitario, no al tumor en sí, mostrando un perfil de efectos secundarios diferente que puede ser ventajoso respecto de las terapias convencionales.

El sistema inmunológico puede suprimir y/o promover el crecimiento del cáncer (Schreiber et al., 2011), por ejemplo, la inflamación crónica puede conducir a la

inmunosupresión local en un contexto tumoral, favoreciendo el desarrollo del cáncer. Por el contrario, la inflamación aguda puede mejorar la función de las células T y la maduración de las células dendríticas, promoviendo efectos antitumorales (Shalapour & Karin, 2015).

Las células tumorales a menudo pueden evitar el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunitario (Drake et al., 2006) a través de cualquiera de los siguientes mecanismos: producir ligandos para co-inhibir receptores, evitando la presentación de antígenos, reclutando células inmunosupresoras y/o secretando factores de inhibición de la respuesta inmune.

Según la Sociedad Estadounidense del Cáncer (ACS), actualmente se están evaluando en más de 900 ensayos clínicos los efectos de la inmunoterapia en el cáncer, a través de diferentes enfoques terapéuticos como vacunas, anticuerpos monoclonales e inmunoterapias no específicas. Por otro lado, se está avanzando también en la combinación del sistema CRISPR-Cas9 y terapias basadas en el sistema inmunitario, así como enfoques y estrategias de terapias con neoantígenos así como, con la familia de inhibidores de proteínas Janus Kinase (JAK) (Pesu et al., 2008). Todos estos avances están muestran un futuro prometedor y, probablemente, pronto tendrá un impacto en la práctica clínica (Xia et al., 2019) (Schumacher & Schreiber, 2015).

Los logros más importantes que han contribuido significativamente al desarrollo de la inmunoterapia en el cáncer son aquellos relacionados con anticuerpos monoclonales utilizados como bloqueadores contra el receptor CTLA-4 y frente a la interacción con PD-1/PD-L1, así como, la terapia de células T del receptor de antígeno quimérico (terapias de células CAR T) (Buchbinder & Hodi, 2015) (L. Chen & Han, 2015) (Kalos et al., 2011) (Grupp et al., 2013) (Grupp et al., 2013) (Brentjens et al., 2013).

La inmunoterapia se postula como un tratamiento prometedor no sólo para el cáncer sino también para varias enfermedades como las patologías autoinmunes, en las que el sistema inmunitario juega un papel central. Además, la inmunoterapia actualmente tiene un impacto positivo en el escenario socioeconómico mundial gracias a sus prometedores resultados en el tratamiento del cáncer en términos de supervivencia del paciente y calidad de vida (Emens et al., 2017).

Se está realizando un importante esfuerzo en el desarrollo de nuevos tratamientos de base inmunológica para el tratamiento del cáncer de pulmón ya que el cáncer de pulmón se diagnostica frecuentemente en estadios tardíos, cuando la cirugía, la quimioterapia y la radiación son mínimamente eficaces. De hecho, hay varios tratamientos actualmente aprobados para el cáncer de pulmón

basados en la inmunología, principalmente para subgrupos de pacientes con NSCLC avanzado.

Cabe señalar algunos anticuerpos monoclonales como Bevacizumab (dirigido a la ruta VEGF/VEGFR (Russo et al., 2017) y Necitumumab (dirigido a la ruta EGFR) (Brinkmeyer & Moore, 2018); y muchos inmunomoduladores como atezolizumab, durvalumab y Pembrolizumab (dirigidos a la ruta PD-1/PD-L1), o Nivolumab (también dirigido a la ruta PD-1/PDL1 y aprobado no sólo para subgrupos de pacientes con NSCLC avanzado sino también para aquellos con SCLC metastásico tratados previamente con tratamientos convencionales) (Kumar et al., 2017) (Ready et al., 2019).

Se observa una mejora importante en el progreso de los pacientes con cáncer de pulmón cuando son tratados con inmunoterapia, sola o en combinación con tratamientos estándar (Visconti et al., 2017). Además, varios fármacos basados en el sistema inmunitario se encuentran actualmente en fase clínica tanto para el tratamiento del cáncer de pulmón como de muchas otras enfermedades, y se necesita más investigación básica para comprender completamente el panorama inmunológico y sus implicaciones en el desarrollo y tratamiento de enfermedades.

## 1.9. UNIONES INTERCELULARES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

En la evolución ha sido clave el desarrollo de uniones intercelulares adhesivas para que los seres multicelulares se organicen en tejidos y órganos complejos. En los vertebrados hay cuatro tipos de uniones intercelulares: desmosomas (macula adherens), uniones adherentes (zonula adherens), uniones ocluyentes (zónula occludens) y las uniones tipo gap. Estos distintos tipos de uniones cooperan, tanto física como funcionalmente, formando un sistema funcional (Figura 1.5).

Los desmosomas y uniones adherentes son uniones de anclaje que unen la actina y los filamentos intermedios del citoesqueleto a la membrana plasmática, en los lugares de unión célula a célula. Las uniones ocluyentes sellan la membrana plasmática para regular el transporte paracelular y son clave para mantener la polaridad celular, mediante la fijación de las proteínas en el lugar correcto.

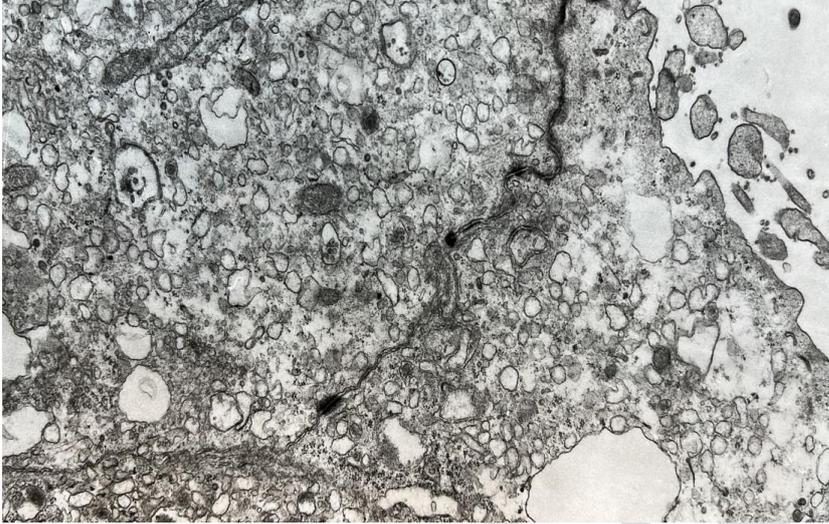


Figura 1.5. Complejos de unión intercelular. ZO: zónula ocludens; ZA: zónula adherens; MA: macula adherens o desmosoma. Microscopía electrónica de transmisión 10.000 X (Cortesía Prof. Aneiros. Departamento de Anatomía Patológica Universidad de Granada)

Las uniones tipo gap (uniones comunicantes o canales intercelulares), que contienen conexina, acoplan las células eléctricamente, permitiendo el movimiento de pequeñas moléculas, proteínas e iones de una célula a otra. Ya que las uniones intercelulares son cruciales para el desarrollo de las capas embrionarias y de los tejidos adultos, la interferencia con su estructura y función, con la consiguiente pérdida de la integridad y polaridad celular, contribuye al desarrollo de muchas enfermedades (Green et al., 2019).

Estas uniones intercelulares se organizan de forma diferente en los distintos tejidos (Figura 1.6).

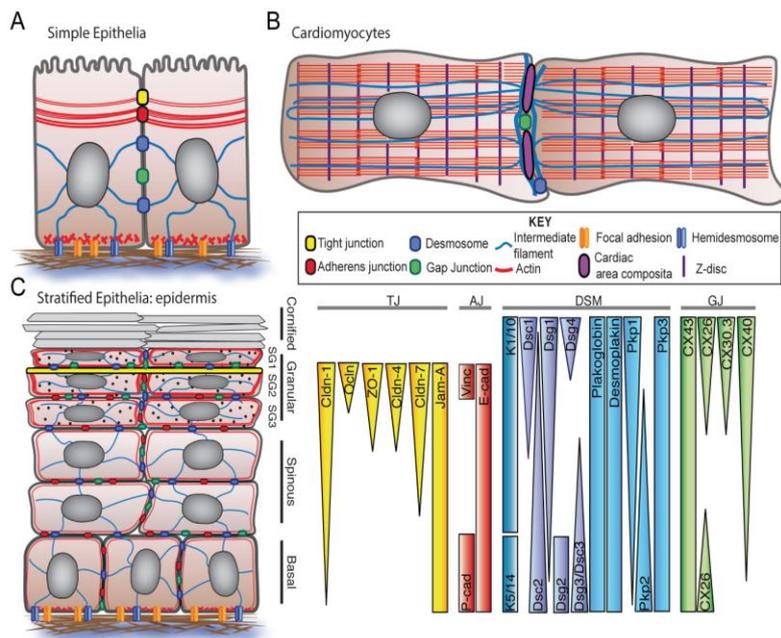


Figura 1.6. Organización de las uniones intercelulares en diferentes tipos de células (Adaptada de (Green et al., 2019)).

En epitelios simples, los complejos de unión comprenden uniones ocluyentes que se localizan en la porción apical de las células, seguidas por uniones adherentes unidas a filamentos (microfilamentos) de actina; posteriormente se sitúan los desmosomas que anclan la red de filamentos intermedios. Las uniones gap se sitúan en las membranas laterales de las células y median la transferencia de pequeñas moléculas e iones de una célula a otra. La adhesión a la matriz celular está facilitada por los hemidesmosomas y adhesiones focales basadas en integrina. En los miocitos cardiacos las unidades contráctiles denominadas sarcómeras y que comprenden filamentos gruesos de miosina y finos de actina, se unen en los discos Z y se estabilizan mediante filamentos de desmina. Las fibras de actina y los filamentos intermedios están anclados en una unión híbrida, denominada área composita, que contiene tanto desmosomas como uniones adherentes. Otros desmosomas de forma independiente anclan filamentos intermedios de actina restantes; las uniones gap, que contienen conexina, facilitan el latido sincrónico del tejido cardiaco. En la epidermis, las proteínas que forman parte de los complejos de unión están polarizadas en las distintas capas (basal, espinosa, granulosa y córnea) y el patrón de distribución

de las mismas y el citoesqueleto unido a ellas ayuda a dirigir el proceso de diferenciación.

### 1.9.1. DESMOSOMAS

Como se ha visto anteriormente, son uniones adhesivas que unen las redes de filamentos intermedios a sitios de fuerte adhesión intercelular. Estas uniones juegan un papel importante en el aporte de fuerza a los tejidos que experimentan estrés mecánico como el corazón y la epidermis. Los desmosomas han evolucionado a partir de las uniones adherentes, con las que tienen semejanzas estructurales, pero funciones distintas. Las uniones adherentes se pueden encontrar en los epitelios simples de organismos tales como las esponjas. En su composición intervienen proteínas de la familia armadillo y caderinas que se encuentran asociadas a microfilamentos de actina. En la evolución los desmosomas aparecen en los vertebrados y utilizan también proteínas de la familia armadillo y caderinas, aunque versiones más modernas de las mismas y, en este caso, se unen a filamentos intermedios. Ambos tipos de uniones, desmosomas y uniones adherentes tienen componentes transmembrana de la familia de caderinas unidoras de calcio (caderinas clásicas en el caso de las uniones adherentes y caderinas desmosómicas en los desmosomas) que se asocian a caderinas de la célula adyacente para mediar la adhesión. La porción citoplásmica de la caderina se une a miembros de la familia de proteínas armadillo, actuando juntas como una plataforma, para asociarse a proteínas adaptadoras que faciliten su unión a elementos del citoesqueleto. La  $\alpha$  catenina sería el adaptador que permite la unión a microfilamentos de actina, en el caso de las uniones adherentes y la desmoplaquina lo sería en los desmosomas, facilitando la unión a filamentos intermedios (Green et al., 2019).

Los desmosomas tal y como se observan con microscopía electrónica de transmisión (Figura 1.7), constan de una placa citoplásmica densa, compuesta por un complejo proteico de anclaje intracelular, que es el responsable de la unión de los elementos citoesqueléticos a las proteínas de unión transmembrana (caderinas). Tienen la forma de un botón o mácula (macula adherens) y se observa como una zona oscura electrodensa. Las membranas de las células adyacentes corren paralelas entre sí, separadas por un espacio de aproximadamente 20nm. En la cara intracelular de la membrana plasmática se observa una gruesa banda, llamada placa desmosómica, en la que aparecen insertados numerosos filamentos intermedios (Figura 1.7).

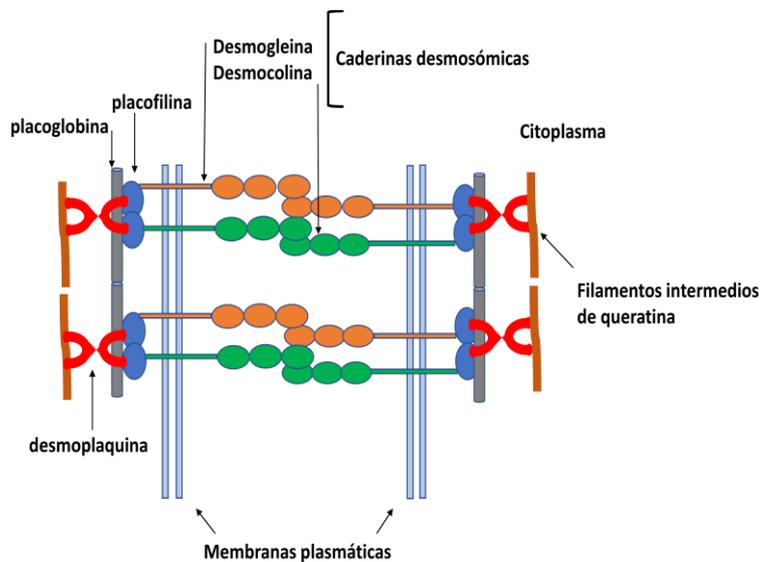


Figura 1.7. Esquema representativo de un desmosoma. En el espacio intercelular se encuentran las caderinas desmosómicas (desmocolina y desmogleína) que se unen a las proteínas de la placa desmosómica (placofilina, placoglobina y desmoplaquina) de ambas células. La desmoplaquina sirve de adaptador para el anclaje de las proteínas de la placa con los filamentos intermedios. (Adaptada de (Green et al., 2019))

Los desmosomas contienen dos conjuntos de cadherinas desmosomales: las desmogleínas y las desmocolinas (Figura 1.7), que se expresan en un patrón específico de tipo celular. Las proteínas de dominio armadillo, placoglobina y placofilina son componentes esenciales de la placa citoplasmática que unen los desmosomas a la red de queratina. También forma parte de la placa la proteína desmoplaquina, que actúa como un adaptador uniendo las proteínas de dominio armadillo a los filamentos intermedios (T. Yin & Green, 2004) (Green et al., 2019). Las placofilinas se consideraron originalmente como componentes no esenciales de la placa de proteínas y su importancia en la formación de la placa se ha descubierto recientemente.

A continuación, comentamos los aspectos más relevantes de los componentes desmosómicos que han sido objeto de nuestro estudio: la proteína de la placa desmosómica placofilina 1, la caderina desmosómica desmogleína 3 y las queratinas (filamentos intermedios).

## 1.10. PROTEÍNAS DE LA PLACA DESMOSÓMICA

### 1.10.1. PLACOFILINA 1

La placofilina 1 (PKP1) pertenece a las proteínas placofilina (PKP) que son miembros de la subfamilia p120-catenina de proteínas relacionadas con el dominio estructural armadillo, y está compuesta por 4 miembros principales:

Por un lado, las placofilinas 1,2 (y sus isoformas PKP1b y PKP2b), y la placofilina 3, se caracterizan principalmente como proteínas desmosómicas y comparten un 55% de similitud en la secuencia de las repeticiones del armadillo y un 50% con el dominio armadillo de p120-catenina. La placofilina 4 (PKP4) comparte entre un 65 y un 81,5 % de similitud en las secuencias repetidas de armadillo con catenina p120,  $\delta$ -catenina y ARVCF, y todas ellas juegan un papel esencial en la estabilización de la adhesión mediada por cadherina en las uniones adherentes (Anastasiadis & Reynolds, 2000) (Hatzfeld, 2005) (Hatzfeld, 2007).

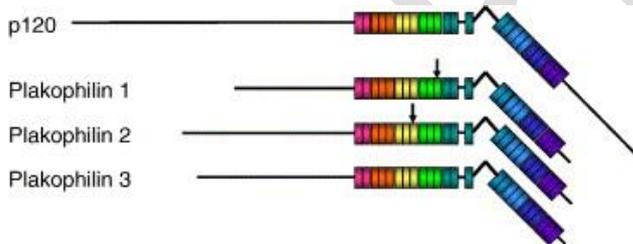


Figura 1.8. Estructura del dominio de placofilinas comparado con p120-cadherina. Adaptada de (Hatzfeld, 2007)

Las PKP tienen un dominio amino terminal largo, un dominio central de nueve repeticiones de brazo y un dominio carboxilo terminal corto (Bass-Zubek et al., 2009), estructura reflejada en la Figura 1.8. Aunque el dominio armadillo tiene funciones de interacción estructural y proteica en otros miembros de la familia p120-catenina, todas las interacciones proteicas que se han observado en las placofilinas, incluida la PKP1, tienen lugar en el dominio N-terminal y el papel del dominio armadillo central sigue siendo desconocido. Además, todas las PKP son proteínas básicas (Hofmann et al., 2006), lo que podría tener efectos en sus interacciones con otras proteínas.

Las placofilinas 1, 2 y 3 se han localizado en los desmosomas y se describen como componentes desmosómicos que interactúan con distintos conjuntos de proteínas desmosómicas.

La proteína PKP1 contiene 9 repeticiones de armadillo y es la más pequeña de las placofilinas (con un peso molecular de 82 KDa), es prácticamente insoluble (Wolf et al., 2010) y la única proteína desmosómica cargada positivamente (Schmidt et al., 1997). Se cree que esta superficie positiva en el dominio armadillo tiene la función de unirse a ligandos aún no identificados (Hatzfeld, 2007). PKP1 incrementa dramáticamente el reclutamiento de proteínas desmosómicas a la membrana plasmática en cultivos de queratinocitos y la fuerte expresión de PKP 1 en las capas suprabasales de queratinocitos epidérmicos se correlaciona con un aumento en el número y tamaño de los desmosomas, lo que sugiere una función de PKP 1 en la regulación del tamaño del desmosoma y su integridad funcional. Este efecto está mediado por el dominio N-terminal de la cabeza, que interactúa con varias proteínas desmosomales como desmogleína 1, desmoplaquina y queratinas (Hatzfeld et al., 2000). Anteriormente se había observado una interacción directa con las queratinas (Hatzfeld et al., 1994) (Kapprell et al., 1988), pero la relevancia fisiológica de este hallazgo aún no está clara, ya que PKP1 parece estar enterrada en la placa desmosómica electrodensa. Esta ubicación parece sugerir que no se produciría interacción con las queratinas. Estudios sobre el papel de la placofilina en el ensamblaje de los desmosomas demostraron una interacción entre PKP 1 y el dominio N-terminal de la desmoplaquina y entre PKP 1 y desmogleína 1, estas uniones estaban mediadas por distintos sitios de unión en el dominio N-terminal de cabeza PKP 1 (Hatzfeld et al., 2000). Sobre la base de los hallazgos que indican que PKP 1 recluta desmoplaquina a sitios de contacto celular, se propuso un modelo, sugiriendo que la plakoglobina sirve como un enlace entre las cadherinas y desmoplaquina, mientras que PKP 1 mejora predominantemente interacciones laterales entre las moléculas de desmoplaquina. Este esquema de asociación se describe en la Figura 1.9.

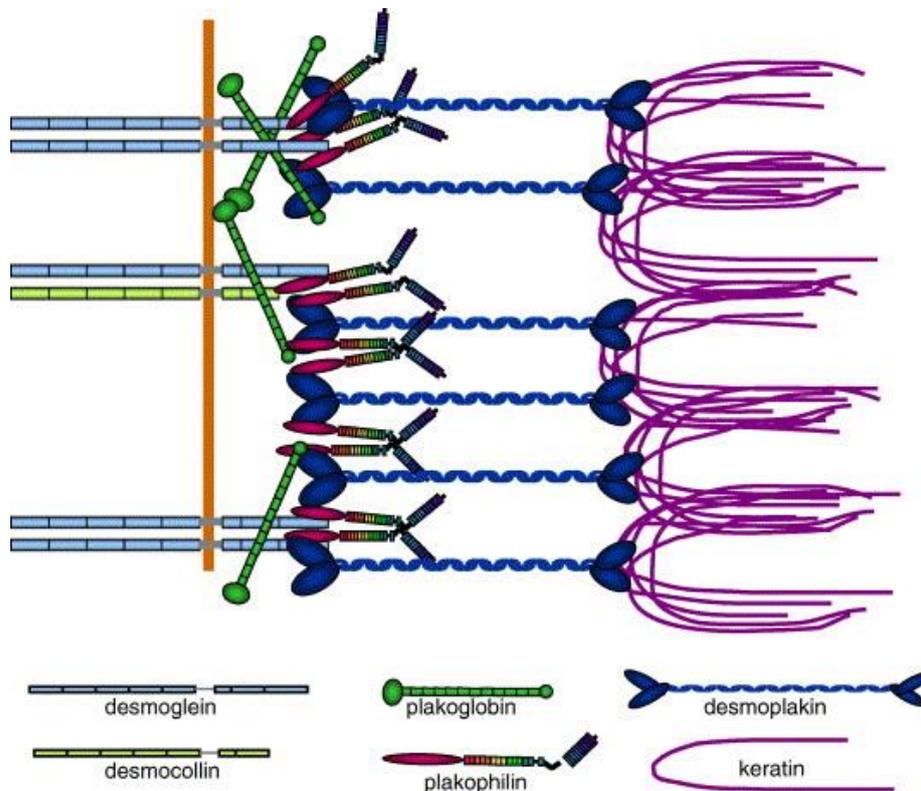


Figura 1.9. Modelo molecular del desmosoma y descripción de la organización de las principales moléculas componentes Adaptada de (Hatzfeld, 2007).

PKP1 presenta dos isoformas ("a" y "b"), resultantes de splicing alternativo, y el ARNm de cada isoforma también puede presentarse en dos formas alternativas de poliadenilación 3'UTR (Schmidt et al., 1997). PKP1a es más pequeña (con 726 aminoácidos) y PKP1b contiene una secuencia de 21 aminoácidos adicionales codificada por el exón 7 y ubicada en la tercera repetición armadillo. Ambas isoformas difieren en abundancia y comportamiento, aunque su significado biológico aún no ha sido determinado.

Las tres PKP se han observado en el núcleo (Bonne et al., 1999) (Heid et al., 1995) (Mertens et al., 1996) (Schmidt et al., 1997) (Schmidt & Jäger, 2005) pero la localización nuclear de PKP1 es la más abundante.

La isoforma "a" de PKP1 es más abundante que la "b" y, mientras que PKP1a se localiza en desmosomas, citoplasma y núcleo, PKP1b sólo se localiza en el núcleo (pero ninguna en el nucléolo) (Schmidt & Jäger, 2005). Se cree que la inserción de 21 aminoácidos presentes en la isoforma "b" puede ser responsable de la abundancia de PKP1b en el núcleo (Schmidt et al., 1997).

Aún no se han encontrado motivos NLS (señales de localización nuclear) en la secuencia de PKP1 (Hatzfeld, 2010). Lo que se sabe es que el carboxilo terminal de PKP1 (especialmente los últimos 40 aminoácidos) (Neuber et al., 2010) es necesario para su ubicación en la membrana plasmática, mientras que el extremo amino terminal está involucrado en su ubicación en el núcleo (Hatzfeld, 2010) (Hatzfeld et al., 2000) (Kowalczyk et al., 1999). Sin embargo, no se descarta que PKP1 pueda asociarse a otras proteínas que contengan NLS para poder migrar al núcleo.

Además, la digestión con cromatina DNasa I reveló una reserva reducida de PKP1 nuclear, lo que sugiere que PKP1 se asocia específicamente con componentes nucleares. Además, el daño en el ADN resultó en el desplazamiento parcial de PKP1 del nucleoplasma al nucléolo, lo que indujo una mayor supervivencia celular y vinculó a PKP1 con la respuesta al daño en el ADN. *In vitro*, se ha demostrado la asociación de PKP1 a ADN monocatenario (ssDNA), pero no a ADN bicatenario (dsDNA) (Sobolik-Delmaire et al., 2010), aunque se postula que *in vivo* PKP1 puede tener una mayor afinidad por la unión a ARN en lugar de ssDNA (Hatzfeld, 2010).

Curiosamente, aunque las funciones nucleares de PKP1 aún se desconocen, los datos sugieren que la ubicación nuclear de PKP1 se correlaciona e incluso puede promover el crecimiento celular (Hatzfeld, 2010).

PKP1 juega un papel importante en la migración y la estabilidad dependiente del calcio de los desmosomas. En los tejidos normales, los desmosomas adoptan un estado independiente del calcio (también llamado "hiperadherencia") (D. R. Garrod et al., 2005) (Kimura et al., 2007) (Wallis et al., 2000), mientras que durante la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos, los desmosomas conducen a una adhesión intercelular más débil al volverse dependientes del calcio y permitir la remodelación del tejido (Kimura et al., 2012) (Wallis et al., 2000).

Sin embargo, la localización citoplasmática de PKP1, y también de PKP3, sugiere un papel adicional de estas proteínas además de su participación en la unión célula-célula. PKP1 y PKP3 se han identificado en gránulos de estrés, que son agregados citoplásmicos de complejos de iniciación de traducción latentes y proteínas de unión a ARN (RBP). Durante el estrés celular, el ARNm se acumula en ellas de forma estable, pero sin traducirse.

En células expuestas a estrés ambiental (es decir, choque térmico o estrés oxidativo) (Hofmann et al., 2006) se han encontrado en gránulos de estrés (SG) las proteínas FXR1, G3B y PABPC1 junto con PKP1 o PKP3. Estas tres ribonucleoproteínas afectan a la rotación y la traducción de los ARNm en el

citoplasma, lo que sugiere un posible papel de PKP1 y PKP3 en la regulación génica postranscripcional (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010).

Además, las PKP se han asociado recientemente con la maquinaria de traducción celular, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel en la regulación postranscripcional y el crecimiento celular. Por lo tanto, se ha demostrado que PKP1 estimula la traducción in vitro y en líneas celulares (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010), y, así mismo, una asociación directa de PKP1, a través de su dominio de cabeza N-terminal, con el inicio de la traducción. Se ha demostrado que el factor eIF4A1: PKP1 es capaz de reclutar eIF4A1 al complejo de iniciación y estimula su actividad helicasa de forma dependiente de concentración, provocando un aumento de la traducción hasta casi duplicarla (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010), y se correlaciona con un tamaño celular y un incremento en la proliferación (Dusek & Attardi, 2011). Curiosamente, eIF4A1 también se ha encontrado en gránulos de estrés junto con PKP1.

En resumen, estos datos sugieren que PKP1, y también PKP3, ejercen algunas funciones en la traducción del ARN y el metabolismo del ARN y, aunque no se han descubierto motivos de unión al ARN, esta asociación podría ocurrir a través de interacciones electrostáticas directas debido a la alta alcalinidad de estas PKP (Hofmann et al., 2006).

#### 1.10.1.1. PKP1 en enfermedades de la piel

En 1997 se describió el primer trastorno hereditario de los desmosomas (McGrath & Mellerio, 2010) y se denominó Displasia Ectodérmica-Fragilidad de la Piel (EDSFS) (Orpha Number: 158668; OMIM 604536). Es una enfermedad rara autosómica recesiva, en la que los pacientes presentan una ablación completa del gen PKP1, se clasifica como una forma suprabasal de epidermólisis ampollosa simple. Forma parte del amplio grupo de displasias ectodérmicas que son trastornos hereditarios que se caracterizan por la alteración de estructuras derivadas del ectodermo.

Se han descrito mutaciones patogénicas no solo en PKP1 sino también en muchos otros genes desmosómicos como DSG1, DSG2, DSG4, PG, PKP2, DSP, PG, DSG1, etc (McGrath & Mellerio, 2010).

Se desconoce la prevalencia de la Displasia Ectodérmica o Síndrome de Fragilidad de la Piel (EDSFS), ya que el número de pacientes descrito es escaso (Kashyap et al., 2015); y estos enfermos presentan una variedad de mutaciones, principalmente en sitios de empalme (Abdalla & Has, 2014) (McGrath & Mellerio, 2010) (Rietscher et al., 2016) (Sprecher et al., 2004). Además, la enfermedad se

asocia con frecuencia a una morbilidad importante, aunque no parece afectar a la esperanza de vida. Se han encontrado fenotipos más leves en pacientes con mutaciones cercanas al dominio carboxilo terminal, lo que sugiere que la proteína resultante es, al menos, parcialmente funcional (Neuber et al., 2010). Sin embargo, los individuos con haploinsuficiencia no parecen presentar ningún trastorno clínico, evidenciando el origen recesivo de la enfermedad.

#### 1.10.1.2. PKP1 en cáncer

La sobreexpresión de placofilinas 1, 2 y 3 no se observa de manera consistente en los diferentes tipos de tumores, aunque es un evento bastante común en el cáncer (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010).

Las placofilinas 1, 2 y 3 tienen un papel dependiente de contexto, que podría depender del estado de fosforilación de las proteínas: en los desmosomas juegan un papel estructural y protector contra el cáncer, y en el citoplasma (y posiblemente en el núcleo) estimulan la proliferación como oncogenes a través de la liberación o traduciendo componentes con potencial oncogénico, y/o activando vías de señalización involucradas en el desarrollo tumoral (Dusek & Attardi, 2011) (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010). Por tanto, los mecanismos reguladores que controlan el equilibrio la redistribución de placofilinas 1, 2 y 3 en diferentes compartimentos celulares puede contribuir a la carcinogénesis (Hatzfeld, 2007).

Esta localización dependiente del contexto sugiere que todas las placofilinas podrían modular la expresión génica en el núcleo, como ya se ha demostrado con PKP2 que puede interactuar con la  $\beta$ -catenina y potencia la actividad transcripcional endógena de la  $\beta$ -catenina-LEF/TCF (Dusek & Attardi, 2011).

Al igual que el resto de PKP, la contribución de PKP1 en el cáncer podría depender del contexto y estar determinada por el estado de distintas vías de señalización: mientras que un incremento en PKP1 podría contribuir a la progresión del cáncer al aumentar la traducción y la proliferación, la pérdida de PKP1 también puede contribuir a la carcinogénesis y/o metástasis, provocando la inhibición de la pérdida de contacto y un aumento de la motilidad (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010) (Wolf et al., 2013).

Aunque se ha encontrado que PKP1 está desregulada en varios tipos de cáncer, su papel en la carcinogénesis sigue sin estar claro debido a los resultados contradictorios descritos en diferentes estudios: regulación al alza, regulación a la baja o niveles mantenidos (Hatzfeld et al., 2014).

La disminución de la expresión de PKP1, y también de PKP3, se ha correlacionado con inestabilidad del desmosoma, menor adhesión celular, aumento de la migración y peor pronóstico en varios tipos de cáncer. Sin embargo, también se ha detectado una sobreexpresión tanto de PKP1 como de PKP3 en diferentes tumores como cabeza y cuello, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata y sarcoma de Ewing (Wolf & Hatzfeld, 2010).

### 1.10.2. DESMOGLEINA 3

Desmoglein 3 (DSG3) es una de las siete cadherinas desmosómicas que median la adhesión célula-célula en los desmosomas. Las cadherinas desmosómicas constituyen la interfaz adhesiva en el dominio central de las uniones tipo desmosomas (DSM), cuya función es anclar los filamentos intermedios de células vecinas a los sitios de adhesión para formar el complejo desmosoma-filamento intermedio esencial en el mantenimiento de la arquitectura y la integridad del tejido (D. Garrod & Chidgey, 2008). Dado que la adhesión célula-célula es un requisito previo en muchos procesos celulares, los DSM se han implicado en la polarización, proliferación, estratificación, diferenciación y morfogénesis epiteliales, así como en el desarrollo embrionario a través de su capacidad para influir en la transducción de señales intercelulares (D. Garrod & Chidgey, 2008) (Thomason et al., 2010). Un desmosoma característico se compone esencialmente de tres familias de proteínas dispuestas para formar dos placas citoplasmáticas simétricas, densas a los electrones, entre células adyacentes que flanquean un dominio central extracelular compartido (Farquhar & Palade, 1963) (Odland, 1958). Las cadherinas desmosómicas, las desmogleínas (Dsg) 1-4 y las desmocollinas (Dsc) 1-3 median la adhesión célula-célula y sirven como andamiaje para el ensamblaje de las placas densas citoplasmáticas. Las proteínas armadillo, placoglobina (Pg) y placofilinas (Pkp), se asocian con las colas citoplasmáticas de las cadherinas desmosómicas para formar la placa densa externa que a su vez se asocia con el dominio N-terminal de la cabeza de la proteína de la familia de las Plakinas, desmoplakina (Dp), que une los filamentos intermedios del citoesqueleto que soportan estrés, al desmosoma, a través de su dominio C-terminal, formando la placa densa interna (D. Garrod & Chidgey, 2008) (Delva et al., 2009). Otro componente esencial es un efector de apoptosis p53 relacionado con PMP-22 (Perp). Aunque se ha demostrado que Perp es crítico en el ensamblaje y mantenimiento de DSM, sus socios interactivos actualmente siguen siendo desconocidos (Ihrie et al., 2005) (Marques et al., 2006).

### 1.10.2.1. Desmogleína 3 y cáncer

Se ha observado una reducción de la expresión de Dsg3 en carcinoma escamoso oral moderado o poco diferenciado, en comparación con el epitelio oral normal (L. Wang et al., 2007). También se ha encontrado que la disminución de la expresión de Dsg3 está asociada con una pérdida de diferenciación y metástasis en el carcinoma de células escamosas orales y de endometrio uterino (Odland, 1958) (Xin et al., 2014).

A pesar de la visión tradicional de los DSM como supresores de tumores y la contribución de Dsg3 en la función adhesiva desmosomal, estudios recientes han descubierto que Dsg3 está sobreexpresado en carcinoma escamoso de cabeza y cuello, pulmón, piel y esófago, etc. (Y.-J. Chen et al., 2007) (Huang et al., 2009) (Fang, Chen, et al., 2014) (Fukuoka et al., 2007) (Savci-Heijink et al., 2009) (Z.-Q. Liu et al., 2007). Además, se ha descrito una correlación entre los niveles de expresión de Dsg3 y la progresión tumoral y la metástasis (Y.-J. Chen et al., 2007) (Fang, Chen, et al., 2014) (Patel et al., 2013), lo que sugiere que, en un contexto dado, Dsg3 puede contribuir a la progresión del cáncer. Estos hallazgos son consistentes con los resultados que indican que el silenciamiento de Dsg3 en células de carcinoma escamoso orales da como resultado la supresión del crecimiento, la migración y la invasión de células tumorales in vitro e in vivo (Y.-J. Chen et al., 2007) (Teh et al., 2011) (Y.-J. Chen et al., 2013).

La migración celular es un proceso de múltiples pasos altamente integrado, iniciado por cambios morfológicos de membrana basados en actina, específicamente en protuberancias de membrana (Bailly & Condeelis, 2002). Las fuerzas impulsoras detrás de la formación y el mantenimiento de estructuras pro-invasivas y migratorias requiere la intrincada regulación espacial y temporal del citoesqueleto de actina (Pollard & Borisy, 2003) (Sahai, 2005). No es sorprendente que la modulación y la organización anómalas del citoesqueleto de actina desempeñen un papel fundamental en la progresión del cáncer y la metástasis (Sahai, 2005). En el contexto del desarrollo y la progresión del cáncer, se sabe que las Rho GTPasas desempeñan un papel fundamental en procesos que incluyen la tumorigénesis, el control del ciclo celular, la invasión y la metástasis (Sahai & Marshall, 2002). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Dsg3 en células de carcinoma aumenta las actividades de Rac1 y Cdc42 y, en menor medida, RhoA, acompañada de lamelipodia y filopodia pronunciadas y una mayor tasa de recambio de actina (Man Tsang et al., 2012). Estos hallazgos respaldan la actividad reguladora de Dsg3 en la organización y dinámica de la actina a través del mecanismo involucrado en Rho GTPasas en la biología de las células cancerosas.

Aunque se ha demostrado que Dsg3 desempeña un papel positivo en la oncogénesis, la evidencia sugiere que Dsg3 puede no funcionar como un factor principal en la formación de cáncer, sino más bien como un factor que promueve la progresión del cáncer. La expresión errónea de Dsg3 en la epidermis de ratones transgénicos impulsada por el promotor K1 provoca hiperproliferación, diferenciación anormal y paraqueratosis de la epidermis (Merritt et al., 2002). Si bien estas características también se observan en enfermedades asociadas con un mayor recambio celular, incluido carcinoma escamoso, en este estudio no se observaron evidencias de desarrollo de tumores (Merritt et al., 2002). Los estudios realizados hasta el momento sugieren que la ablación de Dsg3 no parece promover el desarrollo de tumores, lo que implica que Dsg3 no posee la capacidad supresora de tumores.

La identificación de que la Dsg3 está sobreexpresada en carcinoma escamoso de cabeza y cuello, esófago y pulmón (Y.-J. Chen et al., 2007) (Huang et al., 2009) (Fang, Chen, et al., 2014) (Savci-Heijink et al., 2009) (Fang, Gu, et al., 2014) (Chung et al., 2004), ha llevado a explorar su potencial como marcador de diagnóstico y pronóstico. En carcinoma escamoso de cabeza y cuello es común la metástasis de los ganglios linfáticos regionales, y representa el factor pronóstico más pertinente para estadificación de la enfermedad y selección de la estrategia de tratamiento (Thekdi & Ferris, 2002) (Takes, 2004) (Argiris et al., 2008) (Rhee et al., 2002). Dsg3 ha surgido como un biomarcador preciso para la detección de metástasis en ganglios linfáticos en carcinoma escamoso de cabeza y cuello, discriminando entre ganglios positivos y benignos con una precisión de ~100 % (Patel et al., 2013) (Ferris et al., 2005) (Ferris et al., 2011) (Trivedi et al., 2013) [55,164–166]. Además, al adoptar los análisis de la expresión de Dsg3 en la biopsia del ganglio centinela mediante qRT-PCR y plataformas de inmunomatrix de microfluidos, se puede lograr la identificación de ganglios positivos y negativos dentro de un marco de tiempo intraoperatorio (Patel et al., 2013) (Ferris et al., 2011) (Solassol et al., 2010). Estos avances implican que Dsg3 podría usarse potencialmente como un marcador que permita al médico reducir la disección innecesaria de ganglios linfáticos (Morton & Cochran, 2004) (Cochran et al., 2006) y la frecuencia de falsos negativos para mejorar la precisión diagnóstica y permitir la adaptación de estrategias de tratamiento para pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello. También se ha demostrado que Dsg3 puede ser un valioso marcador en el diagnóstico de carcinoma escamoso pulmonar. La combinación actual de marcadores que incluyen citoqueratina 5/6 y p63 exhibe una sensibilidad y/o especificidad relativamente bajas (Savci-Heijink et al., 2009). Se ha sugerido que Dsg3 no solo se expresa en gran medida en carcinoma escamoso pulmonar (Fukuoka et al., 2007) (Savci-Heijink et al., 2009) (Sun et al., 1979), sino que también parece ser un marcador complementario útil

para diferenciar carcinoma escamoso pulmonar de otros cánceres de pulmón de células no pequeñas (Savci-Heijink et al., 2009).

Aunque Dsg3 se ha propuesto como un objetivo terapéutico potencial en carcinoma escamoso oral, actualmente no hay estudios suficientes que avalen esta posibilidad. Sin embargo, se ha demostrado que el silenciamiento de Dsg3 mediado por ARNi en líneas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello reduce el crecimiento tumoral y la metástasis en estudios de xenoinjertos en ratones BALB/C (Y.-J. Chen et al., 2007) (Y.-J. Chen et al., 2013), lo que indica el potencial terapéutico de Dsg3 para prevenir progresión del cáncer.

No hay duda de que Dsg3 funciona como un receptor de adhesión célula-célula en los DSM. Sin embargo, los datos publicados sugieren que Dsg3 también actúa como un importante regulador de superficie para varias vías de señales que están involucradas en la adhesión celular basada en actina, el cambio morfológico y la locomoción. Al igual que Src y algunas otras moléculas de señalización, Dsg3 parece actuar como un gen pleiotrópico que influye tanto en la adhesión celular como en la locomoción celular, según contexto. En las células epiteliales normales, Dsg3 puede funcionar para facilitar la adhesión célula-célula, pero en las células oncogénicas donde la función del DSM está alterada, la sobreexpresión de Dsg3 puede favorecer su actividad de señalización oncogénica lo que provoca protuberancias de membrana pronunciadas y locomoción celular acelerada. Sin embargo, todavía hay muchas preguntas sin respuesta. Los hallazgos consistentes en carcinoma escamoso han colocado a Dsg3 como un biomarcador prometedor en cáncer y un objetivo terapéutico potencial para prevenir la progresión del cáncer y la metástasis. La aclaración de esta función adicional para Dsg3 mejorará nuestra comprensión del papel de Dsg3 en la biología de las células tumorales y puede tener implicaciones en el desarrollo de la terapia contra el cáncer (Brown & Wan, 2015).

#### 1.10.2.2. Desmogleína 3 y enfermedades de la piel

El conocimiento actual de la DSG3 se basa en gran medida en estudios sobre el pénfigo vulgar (PV), una enfermedad ampollosa infrecuente, de naturaleza autoinmune, que se caracteriza por la pérdida de cohesión entre los queratinocitos en la mucosa oral y la epidermis. El mecanismo patogénico es por la unión de autoanticuerpos IgG (PV-IgG) a la superficie celular, que tienen como diana el dominio extracelular de la DSG3 lo que desencadena una serie de eventos celulares y moleculares. Los anticuerpos anti DSG3 se encuentran generalmente en la fase mucosa de la enfermedad, en la que se desarrollan lesiones en las mucosas; en la fase mucocutánea hay ampollas epidérmicas lo

que coincide habitualmente con la presencia de anticuerpos tanto anti DSG3 como anti DSG1. En el pénfigo foliáceo, otra enfermedad ampollosa de naturaleza autoinmune, los enfermos no presentan lesiones mucosas y tienen autoanticuerpos frente a DSG1 pero no frente a DSG3 (Spindler & Waschke, 2018). Gracias a los estudios sobre el pénfigo se ha puesto de manifiesto el papel fundamental de la DSG3 en la adhesión celular, así como en la transducción de señales.

Se ha demostrado que la adición de PV-IgG a queratinocitos en cultivo promueve la reorganización de los filamentos de actina e induce la fosforilación de DSG3, concomitantemente con su disociación de los desmosomas y endocitosis. De igual forma, se produce un aumento del calcio intracelular y la activación de varias moléculas de señalización: Pg, PKC, p38 MAPK, proteína de choque térmico p27, Src y c-Myc. En conjunto todos estos hallazgos apoyan que DSG3 tiene un papel en las vías de señalización que puede potencialmente contribuir tanto al desarrollo como a la supresión tumoral (Brown & Wan, 2015). Hay estudios recientes además que demuestran que DSG3 regula p53 en respuesta al estrés en los queratinocitos y que esta vía involucra a la proteína YAP (yes-associated protein). Se ha comunicado en la literatura que los enfermos con PV tienen mayor incidencia de neoplasias. Aunque podía pensarse que este hecho guarda relación con el efecto de la terapia inmunosupresora que se les administra o que es consecuencia de la disregulación inmunológica propia de la enfermedad autoinmune, también es lógico suponer que el desarrollo de cáncer puede estar, al menos en parte, relacionado con la pérdida de función de DSG3 (Brown & Wan, 2015).

### 1.10.3. FILAMENTOS INTERMEDIOS

El citoesqueleto es una red de filamentos de proteínas que se encuentran dentro de la célula y que es clave para mantener la forma celular, permitir el transporte de moléculas y el movimiento y desplazamiento celular, así como para la formación de cilios y flagelos y la separación de los cromosomas en la mitosis. Está formado por tres tipos de filamentos proteicos con propiedades diferentes: microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos formados por tubulina.

Los filamentos intermedios, a diferencia de los otros dos componentes, varían dependiendo del tipo de tejido y célula y aunque comparten entre sí ciertas características estructurales, son específicos de tipo celular y hay más de 70 genes involucrados en su formación. En base a sus diferencias estructurales, forma de ensamblaje y patrón de expresión se dividen en cinco subtipos: gliales

(proteína ácida glial fibrilar, vimentina, sinemina y nestina), neuronales (neurofilamentos), musculares (desmina, sincolina), epiteliales (queratinas) y mesenquimales (vimentina) (van Bodegraven & Etienne-Manneville, 2021).

#### 1.10.4. QUERATINAS

Las queratinas (K) son una gran familia de proteínas fibrosas del citoesqueleto presente en las células epiteliales, los filamentos de queratina representan un tipo de filamentos de tamaño intermedio, es decir, filamentos largos y no ramificados de ~10 nm de diámetro (Franke et al., 1978) (Sun et al., 1979) (Moll et al., 1982) (Schweizer et al., 2006) (Oshima, 2007) (Moll et al., 2008). Los filamentos de queratina son elementos esenciales componentes de la estructura tisular normal y tienen una función importante en las células epiteliales. Las queratinas no solo forman una parte del citoesqueleto de las células epiteliales, sino que también sirven como un importante sistema de marcadores de diferenciación, capaces de determinar durante el desarrollo embrionario el tipo de célula epitelial y el estado de diferenciación, así como en tejidos epiteliales autorrenovables, la diferenciación durante su etapa terminal. Las queratinas además, pueden ayudar a determinar el origen de tumores epiteliales y pueden ser útiles para el diagnóstico y, en algunos casos, marcadores de pronóstico de tumores benignos y malignos del epitelio. Además, las mutaciones en los genes de la queratina están asociadas con trastornos específicos de fragilidad tisular.

Las queratinas epiteliales se describieron por primera vez como formadoras de tonofilamentos y relacionadas con la queratina dura del cabello, también se han llamado citoqueratinas (CK) para distinguirlas de las queratinas del cabello (Franke et al., 1978) (Sun et al., 1979). En 1982, Moll et al. (Moll et al., 1982) hicieron una clasificación de las queratinas epiteliales en 19 tipos, y posteriormente se clasificaron en 20 subtipos (Moll et al., 1990) según su peso molecular y pH isoelectrónico. Estos 20 tipos de queratinas han sido designadas K1–K20 (CK1–CK20) y se han clasificado en dos grupos: Tipo I y II (ahora se sabe que representan grupos de homología de secuencia). Las queratinas Tipo I (K9–K20) son queratinas ácidas, mientras que las queratinas Tipo II (K1–K8) son queratinas básicas a neutras. La distinción de estos dos tipos también es válida para las alfa-queratinas ‘duras’ del cabello y las uñas (queratinas del cabello), y previamente las dos familias de queratina capilar fueron designadas como Ha (ácido, Tipo I) o Hb (básico a neutro, Tipo II) (Heid et al., 1986). Como característica única, con respecto al citoesqueleto y las proteínas de filamentos intermedios, las queratinas Tipo I y Tipo II siempre se expresan en pares y de hecho, los

filamentos de queratina están constituidos por un par heteropolimérico de moléculas de Tipo I y Tipo II (1:1) (Moll et al., 2008).

Los genes de queratina representan la mayoría de los genes de filamentos intermedios (Hesse et al., 2001), en el genoma humano se han identificado al menos 54 genes funcionales para queratinas (Schweizer et al., 2006). En 2006, se publicó una nueva nomenclatura consensuada para queratinas de mamíferos siguiendo las directrices de Human and Mouse Genome Nomenclature Committees (Schweizer et al., 2006). Esta nomenclatura de consenso, que incluye tanto queratinas epiteliales como capilares, revisa y amplía la nomenclatura de 1982. Los genes codificantes para queratinas están numerados *KRT1*, *KRT2*, etc., para las proteínas de queratinas correspondientes K1, K2, etc. Entre los 54 genes codificantes para queratinas humanas funcionales hay 28 genes Tipo I y 26 genes Tipo II (Tabla 1.1).

Type I epithelial keratin			Type II epithelial keratin		
Former Nomenclature	New Nomenclature	Expression site	Former Nomenclature	New Nomenclature	Expression site
K9	K9	Spinous-granular layers in palmoplantar epidermis			
K10	K10	Suprabasal epidermal keratinocytes	K1	K1	Suprabasal epidermal keratinocytes
			K2e	K2	Upper spinous and granular epidermal layers
K12	K12	Cornea	K3	K3	Cornea
K13	K13	Suprabasal layer in oral mucosa	K4	K4	Suprabasal layer in oral mucosa
K14	K14	Basal keratinocytes in the epidermis, adnexal gland	K5	K5	Basal keratinocytes in the epidermis, adnexal gland
K15	K15	Hair follicle bulge			
K16	K16	Spinous layer in palmoplantar epidermis, suprabasal layer in oral mucosa, sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound	K6a	K6a	Spinous layer in palmoplantar epidermis, suprabasal layer in oral mucosa, sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound
K17	K17	Myoepithelial cells in sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound	K6b	K6b	
			K6e/h	K6c	
			K7	K7	Simple (ductal) epithelia, secretory portion in sweat gland in skin
K18	K18	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland in skin	K8	K8	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland in skin
K19	K19	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland, outermost layer of hair bulge and outer root sheath	K2p	K76	Gingiva and hard palate
K20	K20	Merkel cells, gastrointestinal epithelia, urothelium	K1b	K77	Eccrine sweat gland duct
			K5b	K78	
			K6l	K79	
			Kb20	K80	

Tabla 1. 1. Clasificación de las queratinas codificadas por genes funcionales humanos para queratinas de acuerdo con (Schweizer et al., 2006), tabla adaptada de (Kurokawa et al., 2011).

En el genoma humano, todos los genes de queratina Tipo I con la excepción del gen K18 se encuentra en el cromosoma 17q21.2, mientras que todos los genes de queratina Tipo II y el gen K18 se encuentran en el cromosoma 12q13.13. Para algunos de estos genes, la función y el significado de las proteínas de queratina codificadas aún no está claro (Schweizer et al., 2006). La expresión y distribución dependiente de tipo de tejido del ser humano se resume en la Tabla 1.2, y una descripción más detallada sobre las queratinas del cabello y las queratinas

epiteliales específicas del folículo piloso y sus especificidades de expresión se presentan en la Tabla 1.3.

Type I epithelial keratin			Type II epithelial keratin		
Former Nomenclature	New Nomenclature	Expression site	Former Nomenclature	New Nomenclature	Expression site
K9	K9	Spinous-granular layers in palmoplantar epidermis			
K10	K10	Suprabasal epidermal keratinocytes	K1 K2e	K1 K2	Suprabasal epidermal keratinocytes Upper spinous and granular epidermal layers
K12	K12	Cornea	K3	K3	Cornea
K13	K13	Suprabasal layer in oral mucosa	K4	K4	Suprabasal layer in oral mucosa
K14	K14	Basal keratinocytes in the epidermis, axillary gland	K5	K5	Basal keratinocytes in the epidermis, axillary gland
K15	K15	Hair follicle bulge			
K16	K16	Spinous layer in palmoplantar epidermis, suprabasal layer in oral mucosa, sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound	K6a	K6a	Spinous layer in palmoplantar epidermis, suprabasal layer in oral mucosa, sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound
K17	K17	Myoepithelial cells in sweat gland, lower hair follicle, outer root sheath, wound	K6b K6e/h K7	K6b K6c K7	Simple (ductal) epithelia, secretory portion in sweat gland in skin
K18	K18	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland in skin	K8	K8	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland in skin
K19	K19	Simple epithelia, secretory portion in sweat gland, outermost layer of hair bulge and outer root sheath	K2p	K76	Gingiva and hard palate
K20	K20	Merkel cells, gastrointestinal epithelia, urothelium	K1b K5b K6i Kb20	K77 K78 K79 K80	Eccrine sweat gland duct

Tabla 1.2. Queratinas humanas epiteliales (no folículo piloso) y principales sitios de expresión específica de tejido y de tipo celular, tabla adaptada de (Kurokawa et al., 2011).

Former nomenclature	New nomenclature	Expression site	Former nomenclature	New nomenclature	Expression site
<i>Hair keratins (Hair fibre keratins)</i>					
Type I			Type II		
Ha1	K31	Entire cortex	Hb 1	K81	Mid cortex
Ha2	K32	Cuticle	Hb 2	K82	Cuticle
Ha3-I, Ha3-II	K33a, K33b	Mid cortex	Hb 3	K83	Mid cortex
Ha4	K34	Upper cortex	Hb 4	K84	Absent from the hair follicle, present in filiform papillae of the tongue
Ha5	K35	Matrix, cuticle	Hb 5	K85	Matrix, cuticle
Ha6	K36	Mid cortex	Hb 6	K86	Mid cortex
Ha7	K37	Cortex of vellus hairs, medulla of sexual hairs			
Ha8	K38	Single cortex cells			
Ka35	K39	Cortex, upper cuticle			
Ka36	K40	Upper cuticle			
<i>Hair follicle-specific epithelial keratins</i>					
Type I			Type II		
K25rs1	K25	IRS (Henle, Huxley, cuticle), medulla	K6rs1	K71	IRS (Henle, Huxley, cuticle), medulla
K25rs2	K26	IRS (cuticle)	K6rs2	K72	IRS (cuticle)
K25rs3	K27	IRS (Henle, Huxley, cuticle), medulla	K6rs3	K73	IRS (cuticle)
K25rs4	K28	IRS (Henle, Huxley, cuticle), medulla	K6rs4	K74	IRS (Huxley)
			K6hf	K75	Companion layer, medulla

Tabla 1.3. Queratinas epiteliales capilares y del folículo piloso de acuerdo con (Schweizer et al., 2007), tabla adaptada de (Kurokawa et al., 2011).

#### 1.10.4.1. Queratinas Tipo I

Los genes de Tipo I que codifican para 17 queratinas epiteliales y 11 queratinas capilares están recogidos en las Tablas 1.1 a 1.3.

##### Queratinas epiteliales humanas:

Con respecto a las queratinas epiteliales humanas Tipo I, el conjunto clásico y bien conocido comprende desde K9–K20, manteniéndose sus designaciones en la nueva nomenclatura Tabla 1.2. De entre ellas en nuestro caso, destaca la K15 como biomarcador inmunohistoquímico en cáncer de pulmón. K15 se ha asociado con células madre de la protuberancia del folículo piloso.

##### Queratinas del cabello humano:

Las queratinas de cabello humano Tipo I, las nombradas anteriormente como Ha1-8, Ka35 y Ka36, ahora se han nombrado como K31–K40. K33a y K33b son isoformas.

Estas queratinas 'duras', más ricas en azufre, presentan patrones de expresión diferenciales en la cutícula y el córtex de la fibra capilar, recogido en la Tabla 1.3 (Rogers et al., 2004) (Schweizer et al., 2007)..

#### 1.10.4.2 Queratinas Tipo II

Las queratinas Tipo II comprenden 20 queratinas epiteliales y seis capilares, recogidas en las Tablas 1.1–1.3.

##### Queratinas epiteliales humanas:

Las queratinas epiteliales Tipo II se clasificaron originalmente en ocho subtipos (K1–K8) (Moll et al., 1982); la mayoría de ellas han mantenido sus designaciones en la nueva nomenclatura. En la actualidad, se han identificado más queratinas Tipo II y para ellas se han añadido nuevos números. De entre ellas en nuestro caso, destacan las K5, K6 y K7 como biomarcadores inmunohistoquímicos en cáncer de pulmón. K5 se expresa en queratinocitos basales con otra queratina Tipo I, K14. La K6 está asociada junto con K16, con la hiperproliferación epidérmica. Las variantes del gen K6 ahora se denominan K6a (KRT6A) (que es la variante principal), K6b (KRT6B) y K6c (KRT6C). La queratina anteriormente nombrada como K6hf, se expresa específicamente en la capa acompañante de la vaina de la raíz del folículo piloso, ahora se ha designado como K75. K7 y K8 son queratinas epiteliales simples que en la piel aparecen típicamente en células secretoras de las glándulas ecrinas y apocrinas (Rogers et al., 2003).

### Queratinas de cabello humano:

Las seis queratinas del cabello humano Tipo II, anteriormente Hb1-6, se han renombrado como K81–K86, recogidas en la Tabla 1.3. De forma similar a las queratinas capilares Tipo I, exhiben sitios de expresión diferencial en el cabello. Como excepción, K84 parece estar restringido a las papilas filiformes de la lengua.

En la piel humana normal, las células epiteliales suelen estar presentes en la epidermis, las unidades pilosebáceas y las glándulas sudoríparas. Los anticuerpos monoclonales monoespecíficos que reconocen específicamente las proteínas individuales de queratina han hecho posible el conocimiento de la distribución de las queratinas en los tejidos epiteliales de la piel normal. Cuando las células basales se diferencian en células escamosas y pierden su capacidad de dividirse, regulan la disminución de la expresión de las queratinas K5 y K14, y expresan K1 y K10. La queratina K2 se expresa más tarde durante la diferenciación terminal, es decir, en las capas espinosas y granulares superiores de la epidermis. K9 se expresa casi exclusivamente en las capas suprabasales de la epidermis palmoplantar, es decir, en piel glabra mientras que las queratinas K6 y K16 se expresan en capas suprabasales de piel glabra (Swensson et al., 1998).

Todas las cadenas de proteína de queratina comparten un plano estructural común, que consta de un dominio central rico en  $\alpha$ -hélice rodeado por dominios N- y C-terminales en gran parte no  $\alpha$ -helicoidales de tamaño variable. La región  $\alpha$ -helicoidal de la queratina humana contiene 310-350 aminoácidos, flanqueada por dominios no helicoidales de cabeza y cola cuya longitud y composición varían ampliamente (Steinert et al., 1985).

El dominio  $\alpha$ -helicoidal es de aproximadamente 47 nm y consta de cuatro segmentos que contienen un patrón de repetición de siete residuos (a-b-c-d-e-f-g)<sub>n</sub> en el que las posiciones a y d son principalmente residuos hidrófobos, y una distribución periódica de residuos cargados con alternancia de cargas positivas y negativas (Maddox et al., 1999). Debido a la repetición de siete residuos y los residuos polares resultantes en un lado de la hélice, las queratinas forman espontáneamente dímeros enrollados en solución (McLachlan, 1978). Las cadenas monoméricas se asocian en paralelo para formar un dímero en forma de varilla. Dos dímeros se asocian de forma antiparalela para formar el tetrámero de queratina (Geisler et al., 1992). El componente principal de la queratina es el tetrámero, y las subunidades están unidas cabeza-cola para dar lugar a cadenas lineales o protofilamentos. Dos protofilamentos se entrelazan para formar protofibrillas y grupos de cuatro protofibrillas se entrelazan para dar lugar a filamentos de 10 nm (Fuchs, 1996). En la célula, in vivo, estos filamentos se organizan en una compleja red supramolecular que se extiende desde la

superficie del núcleo hasta la parte más periférica de la célula, la génesis y mantenimiento de tal red involucra numerosas proteínas accesorias.

Hay una identidad notablemente alta en la secuencia de aminoácidos del dominio  $\alpha$ -helicoidal entre las queratinas Tipo I y Tipo II. Entre las queratinas de un solo tipo, los dominios  $\alpha$ -helicoidales comparten un 50–90% de identidad de secuencia, mientras que las queratinas de distinto tipo presentan sólo aproximadamente un 30% de homología en estas regiones (Hanukoglu & Fuchs, 1983) (Hanukoglu & Fuchs, 1982). Sin embargo, los dominios no helicoidales son diferentes entre las diferentes queratinas, y por lo tanto se consideran candidatos lógicos para determinar las propiedades y funciones diferenciales propuestas para los diversos heterodímeros de queratinas Tipo I y Tipo II en tejidos epiteliales.

Las queratinas se encuentran entre los constituyentes más insolubles de las células. En las células se forman complejas redes de interconexión, que emanan de un anillo perinuclear, a partir del cual las queratinas parece que se conectan a la superficie nuclear y se extienden a lo largo el citoplasma y terminan en la membrana plasmática, en las uniones desmosómicas. Tal asociación entre la membrana plasmática y la superficie nuclear parece proporcionar un continuo vínculo que puede tener implicaciones importantes para la organización del citoplasma, comunicación celular, y tal vez el transporte de información dentro y fuera del núcleo. Los hemidesmosomas conectan una célula epitelial basal a su tejido conectivo subyacente, las queratinas interactúan con ellos de la misma manera que interactúan con los desmosomas.

#### 1.10.4.3. Funciones de las queratinas y enfermedades de las queratinas

Los filamentos de queratina se presentan como haces más o menos densos unidos a los desmosomas y hemidesmosomas, lo que sugiere un papel como estabilizadores estructurales. Una de las principales funciones establecidas para las queratinas es el mantenimiento de la estabilidad mecánica y rigidez de las células y tejidos epiteliales y su protección contra el estrés mecánico (Uitto et al., 2007) (Gu & Coulombe, 2007) (Coulombe et al., 2004) (Magin et al., 2007) (McLean & Irvine, 2007). Se han descrito modelos de ratón knock-out para queratinas, así como modelos de ratón para enfermedades relacionadas con queratinas humanas. Hasta la actualidad, se han descrito 19 genes que codifican para queratinas, incluidas las queratinas del cabello y los genes específicos del folículo piloso, involucrados en mutaciones patógenas. El prototipo es la epidermólisis bullosa simplex (EBS) que está causada por un espectro de mutaciones puntuales de las queratinas K5 y K14 que conducen a la citólisis de

las células basales de la epidermis y lo que produce ampollas epidérmicas. Las mutaciones genéticas de las queratinas expresadas en capas epidérmicas superiores o en sitios específicos del cuerpo, como K1 / K10, K2 y K9, dan lugar a enfermedades caracterizadas por alteraciones epidérmicas, específicas de la capa o del sitio. En general, se cree que la degeneración granular y la epidermólisis que se observan histológicamente en las lesiones de la mayoría de las enfermedades de las queratinas incluyendo EBS, son el resultado de un deterioro de la función de los filamentos de queratina durante el estrés físico (Uitto et al., 2007). A pesar de la importancia de las funciones estructurales de las queratinas, actualmente se acepta que existe una variedad de otras funciones reguladoras y de señalización ejercidas por las queratinas (Moll et al., 2008) (Gu & Coulombe, 2007) (Coulombe et al., 2004) (Magin et al., 2007) (Owens & Lane, 2003) (Ku et al., 2007) (Pekny & Lane, 2007). Así, se incluyen funciones como la protección contra la apoptosis, y la protección del hígado contra el estrés metabólico / tóxico. Sin embargo, no se ha demostrado un papel causal en la tumorigénesis para ninguna queratina (Magin et al., 2007). Un problema importante que permanece sin resolver es el mecanismo por el cual los genes de queratina Tipo I y II, que evolucionaron de forma independiente, comparten la capacidad de regular el tejido y la diferenciación específica en diversos tejidos epiteliales (Takahashi et al., 1999).

#### 1.10.5. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

##### 1.10.5.1. p63-p40

#### Introducción a la familia de genes p53/p63/p73 de factores de transcripción

La importancia de p53 en el mantenimiento de la integridad genómica se destaca por la observación de que la mutación o inactivación de p53 es un evento común en los distintos tipos de cáncer en el ser humano. Casi dos décadas después de que se describiera el gen p53, se identificaron dos miembros adicionales de la familia, p63 y p73, en base a similitudes estructurales en los principales dominios funcionales de p53: el dominio de transactivación (TAD), y los dominios de unión a ADN (DBD) y de oligomerización (OD) (Yang et al., 1998) (Kaghad et al., 1997). En contraste con la comprensión clásica de p53, se ha demostrado que estos nuevos miembros de la familia presentan múltiples isoformas proteicas que resultan del

uso alternativo de promotor y empalme C-terminal. Tanto p63 como p73 incluyen dos subclases de proteínas que contienen dominios TA o  $\Delta N$  en el extremo amino. Las isoformas TAp63 contienen un dominio de transactivación de consenso similar a p53 que puede imitar la función de p53, mientras que las isoformas  $\Delta N$  carecen de este dominio y actúan como dominantes negativos para TAp63/73, así como para p53. La isoforma p40 de p63 carece del dominio N-terminal de transactivación ( $\Delta N$ ). A pesar de la falta de un dominio TA, las isoformas  $\Delta N$  de p63 pueden regular positivamente la transcripción de genes a través de dominios de transactivación adicionales (Dohn et al., 2001) (Ghioni et al., 2002) (Y. Tanaka et al., 2004) (Helton et al., 2006). Poco después del descubrimiento de las isoformas de p63 y p73, se describieron isoformas de p53 transcritas que se coexpresaban con p53 canónico, agregando mayor complejidad biológica que puede influir en el resultado funcional (Bourdon, 2014). Se han descrito hasta la fecha un total de diez isoformas de p63 que se originan a partir de empalmes alternativos en el extremo C-terminal: TA- y  $\Delta N$  - p63 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\epsilon$  (Yang et al., 1998) (Mangiulli et al., 2009) como se puede observar en la Figura 1.10. Estructuralmente, el extremo C-terminal de  $\Delta N$ p63 $\alpha$  contiene más dominios funcionales de proteína, incluido un Motivo Alfa Estéril (SAM) que es un dominio de interacción proteína-proteína, un dominio inhibidor de la transactivación (TID) (Thanos & Bowie, 1999) (Serber et al., 2002), y dos dominios de transactivación alternativos distintos: uno llamado TA2, codificado por los exones 11 y 12 (Ghioni et al., 2002), y otro en el terminal  $\Delta N$  (Dohn et al., 2001) (Helton et al., 2006). Además de p63, se han descrito veintinueve transcritos de ARNm de p73, que pueden no ser todos traducidos, y doce isoformas de la proteína p53 (Bourdon, 2014) (Vikhreva et al., 2018). Los miembros de la familia p53 funcionan como tetrámeros a través de sus dominios de oligomerización, con p63 y p73 interactuando preferentemente entre ellos, más que con p53, y siendo el heterotetrámero la configuración preferida de estos (Coutandin et al., 2009). Se ha demostrado que las interacciones de p63/p73 con p53 ocurren a través del dominio DBD; la forma salvaje de p53 (WT) dirige la degradación de  $\Delta N$ p63 $\alpha$  a través de este dominio (Ratovitski et al., 2001), mientras que la forma mutada de p53 interactúa también con p63 y p73 a través de este dominio, impidiendo así sus capacidades de transactivación (Strano et al., 2000) (Strano et al., 2002). Como tal, las similitudes estructurales entre los miembros de la familia p53/p63/p73 les permiten interactuar entre ellos a través de una variedad de mecanismos. Por lo tanto, el equilibrio de las isoformas en un contexto dado, así como sus niveles de expresión relativos, en última instancia, pueden afectar el resultado biológico.

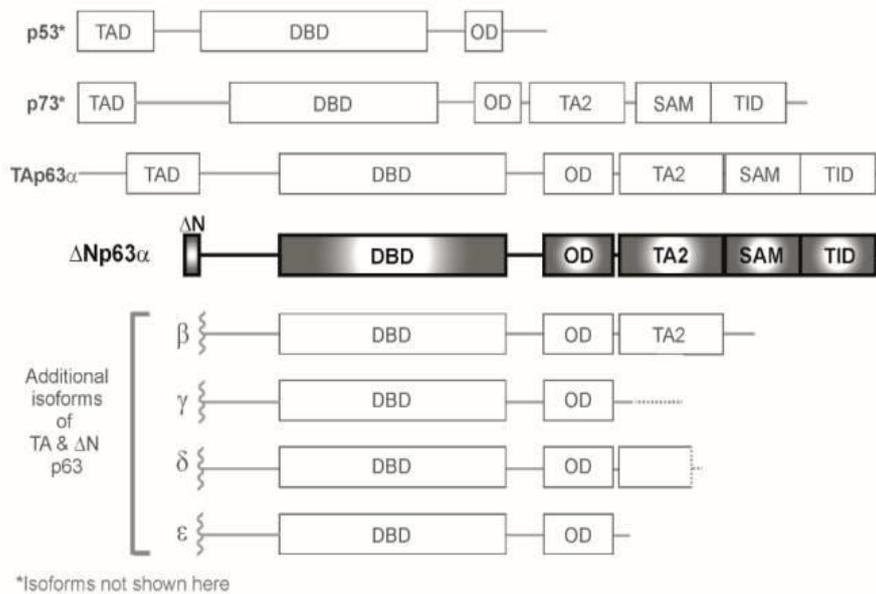


Figura 1.10. Esquema de los miembros de la familia de p53/p63/p73. Tomada de (Moses et al., 2019)

Mientras que la forma canónica de p53 se expresa de forma ubicua y se activa con el estrés celular, las isoformas de p63 y p73 exhiben patrones de expresión específicos de tejido y juegan papeles críticos en el desarrollo normal y homeostasis (Parsa et al., 1999) (Puig et al., 2003).  $\Delta N$  p63 $\alpha$  es la isoforma predominante presente en la epidermis humana adulta y su expresión está asociada con el compartimento proliferativo de la piel (Parsa et al., 1999). Modelos in vivo han puesto de manifiesto que, p63 es esencial para el desarrollo epidérmico normal y la homeostasis (Yang et al., 1999) (Mills et al., 1999) (Koster et al., 2009), y en humanos, las mutaciones de p63 se han asociado con síndromes de displasia ectodérmica que incluyen fenotipos alterados de la piel (Wright et al., 2019). Asimismo, p73 demuestra funciones específicas de tejido, ya que su pérdida se ha relacionado con anomalías en el desarrollo del sistema nervioso y la ciliogénesis (Yang et al., 2000) (Marshall et al., 2016). Inicialmente, se anticipó que las mutaciones en p63 podrían contribuir al desarrollo de cánceres en los que p53 no está mutado; sin embargo, en lugar de mutación, la sobreexpresión de p63 y especialmente las isoformas  $\Delta N$ p63 se han asociado con enfermedades malignas, incluidos los carcinomas escamosos, como los de la cabeza y cuello y piel (Hagiwara et al., 1999) (Y. Y. Li et al., 2015) (Campbell et al., 2018).

#### 1.10.5.1.1. Mecanismos de Regulación Transcripcional por p63

p63 impacta los perfiles de expresión génica tanto a nivel local como global a través de múltiples mecanismos descritos en la Figura 1.11. Estos incluyen la unión directa con promotores génicos, interacción con potenciadores de la expresión génica y definición del entorno de la cromatina (complejos abiertos frente a cerrados) en una manera específica del contexto génico y, la regulación de los ARN no codificantes.

Debido a la homología compartida dentro del dominio DBD entre los miembros de la familia, la unión al ADN es un área en la que el equilibrio de las isoformas es de vital importancia, esquematizado en la Figura 1.11A. Las isoformas  $\Delta Np63$  son capaces de unirse a los sitios canónicos de unión al ADN de p53 y, por lo tanto, competir con p53 y TAp63/73 (Yang et al., 1998); sin embargo, también se han descrito sitios consenso de unión de p63 concretos (Osada et al., 2005) (Perez et al., 2007) (Ortt & Sinha, 2006).  $\Delta Np63\alpha$  puede tanto activar como reprimir la transcripción de genes (Dohn et al., 2001) (Ghioni et al., 2002) (Helton et al., 2006). Usando un enfoque de mapeo de todo el genoma, se encontró que p63 y p73 compartían dianas genómicas en una línea celular de carcinoma de cuello uterino in vivo, lo que podría traducirse en un resultado biológico influenciado por los niveles relativos de expresión de las isoformas presentes en un contexto celular determinado (Yang et al., 2010). Los cofactores dependientes de contexto también afectan a la regulación directa de genes. Se ha demostrado que  $\Delta Np63\alpha$  interactúa físicamente con factores de transcripción, tales como SOX2, un factor de transcripción asociado con células madre, con c-Rel, un miembro de la familia NF- $\kappa$ B (King et al., 2008), y Y-Box binding protein-1, una proteína de unión a ácido nucleico involucrada en múltiples procesos dependientes de ADN/ARN (Di Costanzo et al., 2012). La cooperación de cada uno de estos factores con  $\Delta Np63\alpha$  se ha relacionado con supervivencia y/o proliferación.

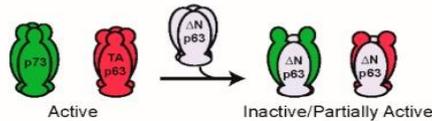
También p63 puede influir en la expresión génica de manera global a través de la remodelación de la cromatina como se describe en la Figura 1.11B. En un estudio de

### A. Direct promoter binding at p63 or p53 binding sites

- Activation or repression of gene transcription
- Interaction with other transcription factors (TF)
- Interference with other family members

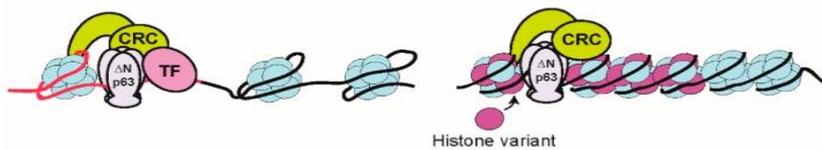


- Influenced by stoichiometry



### B. Interactions with enhancers and chromatin remodeling complex (CRC)

- Open or closed chromatin structure



### C. Modulating non-coding RNA

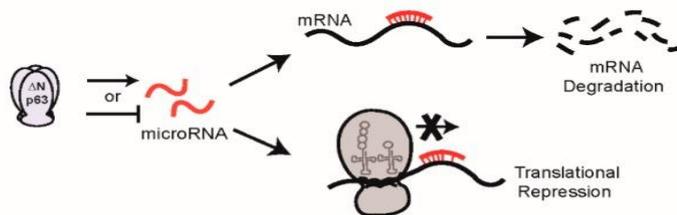


Figura 1.11 Mecanismos mediante los cuales p63 media la expresión génica.  
Tomada de (Moses et al., 2019)

perfil epigenómico, se determinó la unión de p63 en los sitios potenciadores de la expresión génica durante la diferenciación epidérmica, e inesperadamente, el patrón de unión de p63 se mantuvo relativamente sin cambios en el transcurso de este proceso (Kouwenhoven et al., 2015). El marcaje conjunto de p63 y H3K27ac, que es un marcador de actividad, demostró una correlación con la expresión de genes cercanos, lo que sugiere que p63 puede servir como un "marcador" para loci genómicos en el linaje epitelial que luego puede activarse por factores de transcripción adicionales (Kouwenhoven et al., 2015). Además, se sabe que se requieren p63 y las subunidades catalíticas del complejo remodelador de cromatina BAF (SWI/SNF) (Brg1 o BRM) requieren para mantener un entorno de cromatina en estado abierto específico del tipo de célula, que controla los potenciadores génicos epidérmicos durante la diferenciación; esta relación no se conservó en las células que carecían de p63.

Mecánicamente, en presencia de p63, BAF desplaza los nucleosomas alrededor de los sitios de unión de p63 y recluta maquinaria transcripcional (Bao et al., 2015). Por el contrario, una subunidad SWI/SNF, ACTL6A, se asocia físicamente con  $\Delta Np63\alpha$  en elementos reguladores para disminuir la accesibilidad de la cromatina, lo que resulta en perfiles transcripcionales de genes alterados en un subconjunto de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) (Saladi et al., 2017).

Los ARN no codificantes, como los microARN (miARN) y los ARN largos no codificantes (lncARN), son mecanismos alternativos mediante los cuales la transcripción génica puede ser regulada indirectamente por p63 como se puede observar en la Figura 1.11C.

Los miARN (aproximadamente de 19 a 22 nucleótidos) reconocen y se unen a las secuencias 3'-UTR del ARNm diana, induciendo así la degradación y/o impidiendo la traducción, lo que puede ser activado o reprimido por p63 y otros reguladores. Los miARN diana para p63 pueden afectar la expresión tanto de factores reguladores epigenéticos, como reguladores transcripcionales directos, para alterar la respuesta y la regulación del crecimiento de los queratinocitos en el tratamiento con quimioterapia (Antonini et al., 2010) (Ory et al., 2011) (Lefort et al., 2013) (Ratovitski et al., 2001). Los lncRNA son ARN poliadenilados de más de 200 nucleótidos que no tienen un marco abierto de lectura; modulan la expresión génica a través de mecanismos de amplio alcance involucrando tanto la regulación transcripcional como la postranscripcional (Cheetham et al., 2013). Los lncRNA están estrictamente regulados en la biología normal, pero están desregulados en el cáncer, incluido el cáncer HNSCC (X. Li et al., 2017) (Camacho et al., 2018), y recientemente se han identificados como dianas de  $\Delta Np63\alpha$  (Qian et al., 2017).

#### 1.10.5.1.2. $\Delta Np63\alpha$ es esencial para la morfogénesis normal y la homeostasis del epitelio escamoso

Los primeros estudios en ratones p63  $-/-$  revelaron una ausencia dramática de epitelio escamoso estratificado, esto sugirió funciones para p63 en el compromiso de linaje y/o mantenimiento de células madre (Yang et al., 1999) (Mills et al., 1999). Siguiendo estas observaciones iniciales, varios grupos crearon modelos para explorar el impacto de la ganancia o pérdida de una sola isoforma de p63. Los estudios incluyeron sobreexpresión basal de células knock-in específico de tejido (sobre un background genético ausente para p63), y líneas transgénicas knock-out específicas de isoforma. En un modelo, TAp63 $\alpha$  la sobreexpresión impulsada por el promotor de queratina 14 en ratones WT

resultó en una epidermis hiperplásica y pérdida de diferenciación terminal, lo que sugiere que la isoforma TAp63 $\alpha$  es responsable de dirigir la estratificación epitelial (Koster et al., 2004). Sin embargo, los estudios knock-in en un background genético ausente para p63 no reflejaron estos efectos, revelando sin embargo, que la reconstitución de TAp63 $\alpha$  en queratinocitos expresando queratina 5 fue insuficiente para generar una epidermis completa (Candi et al., 2006). En contraste con estos estudios de TAp63 $\alpha$ , la expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  impulsada por queratina 5 en ratones p63  $-/-$  demostró que restaura parcialmente la capa basal epidérmica y la expresión de las queratinas 5 y 14, pero no de los marcadores queratina 1 o loricrina de la capa epidérmica superior (Candi et al., 2006). Del mismo modo, en un modelo separado, la inducción de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  o  $\Delta$ Np63 $\beta$  por el promotor de queratina 5 en un background genético ausente para p63 restauró parcialmente la integridad epitelial, estratificación y la expresión de marcadores de diferenciación, lo que llevó a la conclusión de que  $\Delta$ Np63 $\alpha$  o  $\Delta$ Np63 $\beta$  pueden iniciar la estratificación epidérmica (Romano et al., 2009). De acuerdo con un papel para  $\Delta$ Np63 $\alpha$  en la regulación del desarrollo y compromiso epidérmico, la eliminación específica de las isoformas  $\Delta$ Np63 $\alpha$  reiteraron en gran medida el fenotipo original de los ratones nulos para p63 (Romano et al., 2012). Tomados en conjunto, los estudios publicados sugieren que se requiere un balance finamente ajustado de isoformas para completar la estratificación epidérmica. Se ha descrito además, un mayor grado de formación epidérmica estructurada y diferenciación en ratones que expresaban tanto TAp63 $\alpha$  como  $\Delta$ Np63 $\alpha$  con expresión de queratinas 1, 5, 14 y loricrina, en comparación con la reconstitución de una sola isoforma (Candi et al., 2006).

Cada vez hay más pruebas que respaldan el papel de p63 en el mantenimiento de las células madre (Pellegrini et al., 2001) (Senoo et al., 2007) (Melino et al., 2015). El alto potencial replicativo de las células madre, junto con estudios que sugieren el agotamiento de las células progenitoras y la diferenciación no regenerativa en ratones deficientes en p63 (Yang et al., 1999) (Romano et al., 2012), respalda aún más la hipótesis de que p63 participa en el mantenimiento de la capacidad regenerativa de la célula madre epitelial. Dentro de la epidermis,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  está altamente expresado en células madre (Senoo et al., 2007) y en compartimentos de queratinocitos basales de células epiteliales glandulares y estratificados (Pellegrini et al., 2001) (Senoo et al., 2007) (Melino et al., 2015). Los datos publicados indican que la actividad de la isoforma de p63 está implicada en la promoción del mantenimiento de las células madre y la renovación de los tejidos.

Además del papel que juega p63 como factor de transcripción que actúa directamente sobre genes que determinan el desarrollo normal de la piel, parece

evidente que p63 juega un papel más amplio como regulador del destino de las células epidérmicas a través de mecanismos reguladores epigenéticos.

Una vez que el tejido se ha establecido, la homeostasis epidérmica requiere un equilibrio entre influencias de crecimiento positivas y negativas, que pueden incluir señalización de proliferación alterada e inducción de diferenciación, senescencia y apoptosis como se representa en la Figura 1.12, todos los cuales están bajo la influencia de  $\Delta Np63\alpha$  y su activación/represión de dianas situadas aguas abajo en el genoma (Testoni et al., 2006).

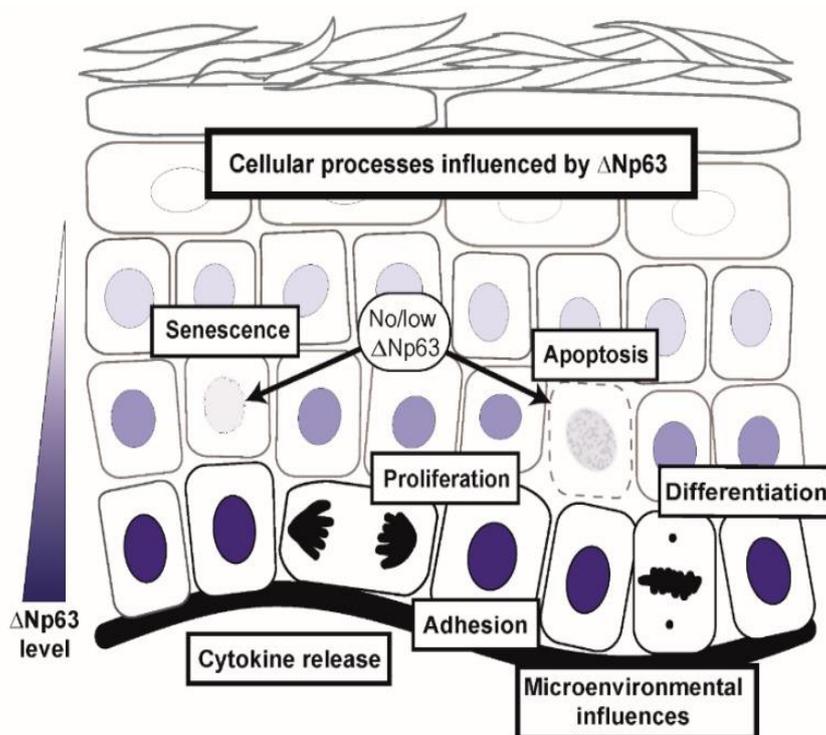


Figura 1.12.  $\Delta Np63\alpha$  regula los procesos biológicos intrínsecos y extrínsecos en la morfogénesis epidérmica normal y en homeostasis. Tomada de (Moses et al., 2019)

Hay estudios cada vez más relevantes centrados en el papel de p63 en la regulación del complejo de diferenciación epidérmica (EDC).

Por lo tanto,  $\Delta Np63\alpha$  es un regulador clave de la morfogénesis epidérmica y la homeostasis del tejido epitelial. Además de dirigir directamente la transcripción de genes, p63 funciona como un impulsor clave de las redes críticas globales vinculadas a la identidad celular y la determinación del destino celular. La expresión desregulada de p63 es una característica común de los tipos de cáncer

escamoso que surgen en distintos órganos y se cree que contribuye al desarrollo del cáncer a través de la interrupción de numerosos procesos celulares como se observa en la Figura 1.12. Además, influye en el compromiso con la proliferación y la supervivencia del linaje de queratinocitos,  $\Delta Np63\alpha$  puede modular el microambiente tisular, reclutando componentes inmunes y alterando potencialmente el equilibrio entre vigilancia inmunológica y evasión inmunológica (Moses et al., 2019).

#### 1.10.5.2. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TIROIDEO 1

El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) es un factor de transcripción específico de tejido con una estructura de plegamiento de proteína de homeodominio. Se expresa principalmente en células diferenciadas derivadas del endodermo del intestino anterior y del neuroectodermo, incluyendo células foliculares tiroideas y células epiteliales alveolares tipo II. Regula la expresión de genes con funciones relevantes en los tejidos tiroideo y pulmonar, promueve el desarrollo y la diferenciación de embriones, y juega un papel clave en el mantenimiento de la función normal de las células de las vías respiratorias. Es además, especialmente útil como marcador molecular para el diagnóstico de tumores de tiroides y pulmón (Phelps et al., 2018) (Oktay et al., 2020).

El factor de transcripción tiroideo-1 (TTF-1), también conocido como proteína de unión potenciadora específica del tiroides (NKx2.1), es uno de los factores de transcripción homólogos en la familia del gen NKx2. El gen TTF-1 se encuentra en la región q12-q21 del cromosoma 14 humano. El gen TTF-1 humano contiene una región homeobox y un motivo codificante de 17 aminoácidos que es exclusivo de la familia de factores de transcripción NKx y codifica para una proteína nuclear con una masa molecular relativa de 38.000. La proteína TTF-1 contiene una secuencia altamente conservada de 371 aminoácidos con una estructura tridimensional que contiene un dominio de unión a ADN (DBD) y dos dominios activos transcripcionales (TAD). La expresión de TTF-1 está estrictamente regulada durante el período de desarrollo embrionario, aparece primero en el endodermo del intestino anterior temprano y luego se expresa abundantemente en las células precursoras traqueales generadas a partir de los primordios pulmonares. Después del nacimiento, TTF-1 se expresa de forma estable en células alveolares tipo II. En la glándula tiroides, TTF-1 se expresa durante la formación del tiroides y es fundamental para el desarrollo temprano del tiroides. Además, TTF-1 también se expresa en el cerebro anterior ventral, el diencéfalo, el telencéfalo cercano e hipotálamo. Durante el desarrollo embrionario, TTF-1 se

expresa ligeramente en el hipotálamo después del nacimiento y juega un papel importante en el desarrollo sexual (Civitareale et al., 1989) (Abramowicz et al., 1992) (Civitareale et al., 1993) (Ikeda et al., 1995) (Stahlman et al., 1996).

La región reguladora de la expresión del gen TTF-1 tiene elementos CRE (ubicados en el promotor del gen TSHR) regulado por la hormona estimuladora del tiroides (TSH), el factor nuclear (NFI) y el sitio de unión del propio TTF-1. Cuando la hormona TSH se une al receptor de la hormona estimulante del tiroides en la superficie celular, se acopla con la subunidad alfa de la proteína G, lo que lleva a la activación de cAMP a través de la mediación de la proteína G, para activar la proteína quinasa A (PKA). Tras la activación de la PKA, se activa el TTF-1 nuclear aumentando su expresión. Además, TTF-1 puede activar su propia expresión a través de dos sitios de unión de TTF-1 con el receptor de tirotrópina, para formar una retroalimentación positiva y lograr la autorregulación de TTF-1 (Nguyen et al., 2000), el esquema de la regulación está recogido en la Figura 1.13.

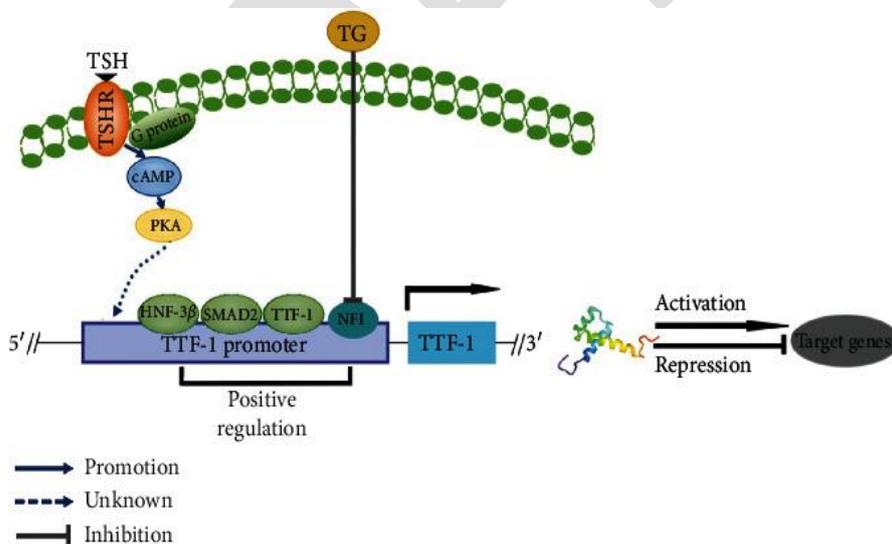


Figura 1.13. Mecanismo regulatorio de la expresión de NKx2-1/TTF-1. Modificado de (Guan et al., 2021)

Recientemente se ha demostrado también que entre los factores de transcripción que interactúan con TTF-1 se encuentran: HNF-3 $\beta$ , Smad2, FOXA1, FOXP2 y GATA6, que regulan la actividad transcripcional de TTF-1 en las células del epitelio pulmonar (Ikeda et al., 1996) (Oguchi & Kimura, 1998) (Z. Yin et al., 2006) (Minoo et al., 2007) (B. Zhou et al., 2008) (Y. Li et al., 2013). Además, los genes LMO3, E2F3 y las ciclinas B1 y B2 inducen la expresión de TTF-1, mientras que MUC5A, FGFR1 y MET inhiben su expresión (Watanabe et al., 2013).

Por otro lado, la modificación covalente por fosforilación-desfosforilación y la glicosilación también son fundamentales para la regulación de la expresión de TTF-1. La regulación también puede interferir con el plegado adecuado del homeodominio de TTF-1 y así modular su actividad de unión al ADN, afectando la expresión de TTF-1 (Tell et al., 2002). Por tanto, los estudios conocidos hasta la fecha, apuntan a una complejidad elevada en el mecanismo de regulación de la expresión de TTF-1.

#### 1.10.5.2.1. Relación de TTF-1 con cáncer de pulmón

Un gran número de estudios han demostrado que TTF-1 juega un papel vital en la aparición de cáncer de pulmón. Se ha demostrado una amplificación significativa del locus del gen TTF-1 en el adenocarcinoma de pulmón, lo que conduce a una mayor proliferación y viabilidad de las células cancerígenas de pulmón (Weir et al., 2007) (Kendall et al., 2007) (H. Tanaka et al., 2007) (Kwei et al., 2008). TTF-1 se expresa en casi el 75% de los adenocarcinoma de pulmón no mucinosos. Sin embargo, el carcinoma de células escamosas de pulmón no expresa TTF-1, por lo que es comúnmente utilizado para distinguir el adenocarcinoma de pulmón primario de otros tumores metastásicos y por tanto, es relevante en el diagnóstico diferencial de cáncer de pulmón (Kaufmann & Dietel, 2000). Además, la proporción de la expresión de TTF-1 está estrechamente relacionada con el grado de diferenciación del tejido tumoral en el adenocarcinoma de pulmón. Dada la relevancia de TTF-1 como marcador de diagnóstico también se ha analizado el valor pronóstico de este marcador en NSCLC, especialmente en adenocarcinoma de pulmón y se ha tratado de relacionar con la supervivencia de los pacientes. Aunque no todos los resultados han sido concluyentes en este aspecto (Puglisi et al., 1999) (Anagnostou et al., 2009), estudios más recientes parecen indicar que TTF1 es un predictor independiente de la supervivencia en adenocarcinoma avanzado (Schilsky et al., 2017).

TTF-1 es por tanto actualmente, de gran valor en el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón, aunque su eficacia como marcador de pronóstico necesita

más investigación. Además, TTF-1 está sobrepresado en carcinoma de pulmón de células pequeñas (Takeuchi et al., 2020) (Horie et al., 2018) (Hokari et al., 2020) y en otros tumores neuroendocrinos de origen extrapulmonar.

#### 1.10.5.2.2. TTF-1 y la enfermedad del tiroides

TTF-1 es el factor principal que promueve la diferenciación, el desarrollo y la proliferación del tiroides durante la etapa embrionaria y es también responsable de mantener la función normal del tiroides después del nacimiento. La mutación del gen TTF-1 es un factor importante causante de hipotiroidismo congénito, incluidas la mutación por inserción, mutación heterocigota y mutación por delección. El TTF-1 mutante no puede unirse al ADN diana, por lo que pierde su función reguladora, afectando a la diferenciación normal y maduración de las células tiroideas.

Se han identificado algunas mutaciones de TTF1 en familias con bocio multinodular y carcinoma papilar de tiroides. Además, hay estudios que sugieren que TTF-1 puede influir a la aparición de enfermedades autoinmunes del tiroides por el papel regulador que tiene sobre la expresión de moléculas del Complejo principal de histocompatibilidad MHC-I (Schuppert et al., 2009).

Las mutaciones de TTF-1 conducen a enfermedades de presentación infrecuente y de herencia autosómica dominante con manifestaciones clínicas por parte del sistema nervioso, pulmón y tiroides (síndrome cerebro-pulmón-tiroides). La clínica es variable e incluye cuadros de corea, hipotiroidismo y distrés respiratorio (Shetty et al., 2014).

#### 1.10.5.3. NAPSINA A

Napsina A (Novel Aspartic Proteinase of the pepsin family A) es una proteínasa aspártica funcional que se expresa en neumocitos tipo II del parénquima pulmonar normal y en los túbulos proximal y contorneado del riñón donde se cree que funciona como una proteasa lisosomal implicada en el catabolismo de proteínas (Mori et al., 2002). Está presente en los lisosomas de los neumocitos tipo II y macrófagos alveolares (probablemente después de la fagocitosis) y en menor grado en acinos y ductos pancreáticos (Mori et al., 2001). La Napsina A se detecta por primera vez al comienzo de la embriogénesis de neumocitos tipo II, se sigue expresando en células maduras de tipo II (Mori et al., 2001), y parece estar involucrada en la maduración del péptido SP-B (que forma parte del surfactante pulmonar) biológicamente activo (Ueno et al., 2004). En el pulmón,

La Napsina A es idéntica a proteínas TAO1 y TAO2 detectadas previamente por electroforesis en gel bidimensional de adenocarcinoma de pulmón (Tatnell et al., 1998). Mediante inmunohistoquímica su tinción se observa en el citoplasma con un patrón granular.

La Napsina B, otra isoforma de la Napsina, se transcribe exclusivamente en células relacionadas con el sistema inmunitario, carece de un codón de parada en el marco de lectura, y se cree que es un pseudogen (Tatnell et al., 1998).

#### 1.10.5.3.1. Napsina A y Tumores de pulmón

La Napsina A es fuertemente positiva en un alto porcentaje de los adenocarcinomas de pulmón por inmunohistoquímica. Los estudios publicados hasta la fecha indican que en cáncer de pulmón, los carcinomas de células escamosas, carcinomas de células pequeñas y tumores carcinoides son negativos para este marcador (Hirano, 2003). En el caso de los adenocarcinomas de pulmón el porcentaje de positividad para Napsina A difiere entre los diferentes estudios publicados entre el 58% y el 91% de los casos (Hirano, 2003) (Ueno et al., 2003) (Inamura et al., 2005) (Suzuki et al., 2005) (Hirano et al., 2000) (Dejmek et al., 2007) (Weidemann et al., 2021). En general, los porcentajes más bajos corresponden a estudios que usaron micromatrices de tejido (Terry et al., 2010), especímenes de biopsia (Mukhopadhyay & Katzenstein, 2011), o material de citología (Stoll et al., 2010). En un estudio con 70 carcinomas de células escamosas pulmonares o extrapulmonares no se encontró expresión para Napsina A (Fatima et al., 2011)(Ordóñez, 2012). Estos resultados son superponibles a los obtenidos en estudios más recientes, con mayor número de muestras (Weidemann et al., 2021). Se ha sugerido que la positividad observada en algunos estudios de carcinomas de células escamosas de pulmón podría ser debido a la presencia de macrófagos intraalveolares y neumocitos de tipo II, ya que los estudios se realizaron en secciones de bloques de células preparados a partir de biopsias por aspiración con aguja fina, y en estudios de micromatrices, en los que a veces puede ser difícil determinar si las células positivas son células tumorales o, en realidad, representan células no neoplásicas atrapadas dentro del tumor (Ordóñez, 2012).

En relación con las aplicaciones diagnósticas de Napsina A hay que tener en cuenta que se ha vuelto cada vez más importante distinguir entre adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas de pulmón debido al desarrollo de nuevas terapias que, pueden tener efectos terapéuticos adversos dependiendo de la histología del tumor. Aunque el diagnóstico diferencial entre adenocarcinomas y los carcinomas de células escamosas es relativamente fácil

en secciones teñidas con hematoxilina y eosina cuando los tumores están bastante bien diferenciados, cuando están pobremente diferenciados, su distinción puede ser difícil, especialmente en muestras de biopsia pequeñas. El diagnóstico diferencial, se puede mejorar en gran medida, por el uso de la inmunotinción con Napsina A, combinada con otros marcadores, como TTF-1, queratina 5/6, p63 y queratina 7.

Los mesoteliomas epitelioides pueden confundirse potencialmente con un adenocarcinoma de pulmón que afecta a la pleura. Varios estudios inmunohistoquímicos, sin embargo, han demostrado que dado que Napsina A se expresa con frecuencia en los adenocarcinomas de pulmón, pero está ausente en mesoteliomas, la inmunotinción con este marcador puede ayudar a discriminar entre estos dos tipos de neoplasias malignas (Hirano et al., 2000) (Dejmek et al., 2007). Por lo tanto, Napsina A debe incluirse en el panel de marcadores inmunohistoquímicos utilizados para evaluar neoplasias malignas de base pleural (Ordóñez, 2003) (Ordóñez, 2007).

Los carcinomas de células renales, particularmente papilares y de células renales claras, expresan Napsina A (Stoll et al., 2010) (Ye et al., 2011) (Bishop et al., 2010) (Argani et al., 2010) (Weidemann et al., 2021); la inmunotinción con este marcador puede tener alguna utilidad para ayudar en el diagnóstico de estos tumores. En comparación con Pax-8, otro marcador para los carcinomas de células renales, Napsina A parece ser menos sensible, pero más específico (Laury et al., 2011). Pax-8, se expresa con frecuencia en otros tumores, especialmente en carcinomas de tiroides, (Laury et al., 2011) (Puglisi et al., 2000) (P. Zhang et al., 2006) (Nonaka, Tang, et al., 2008), adenocarcinomas de endometrio y cuello uterino, (Laury et al., 2011) (Nonaka, Chiriboga, et al., 2008) (Laury et al., 2010), tumores epiteliales del timo (Laury et al., 2011), y carcinomas neuroendocrinos del páncreas y el tracto gastrointestinal (Long et al., 2010).

En una reciente revisión en la que se analizaron más de 11.000 muestras de tejido correspondientes a 115 tipos distintos de tumores se ha encontrado que al menos 16 tipos puede tener algún tipo de expresión de Napsina A, en al menos un caso. Los tipos histológicos con expresión más consistente de Napsina A, en este estudio, fueron los adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de células claras de riñón, endometrio y ovario y el carcinoma papilar renal (Weidemann et al., 2021). Algunos estudios señalan la posibilidad de que la positividad para Napsina A en algunos tumores, sobre todo de células claras, pueda a veces ser consecuencia de la presencia de biotina endógena, lo que puede obviarse con el empleo sistemático de controles negativos (Weidemann et al., 2021).

Como las características histológicas de los adenocarcinomas de diferentes sitios se superponen, se plantea un importante problema diagnóstico cuando se

estudian metástasis, de origen desconocido, de tumores que pueden tener marcadores comunes. Por ello la Napsina A y resto de marcadores se deben emplear en paneles diagnósticos con la máxima capacidad discriminante.

COPIA

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

COPIA

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados y la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, con una estimación de 2,20 millones de nuevos casos y 1,79 millones de muertes al año (Stewart et al., 2014). En los últimos años, se han realizado mejoras sustanciales en la comprensión general de la biología de la enfermedad, en la aplicación de biomarcadores predictivos y en los tratamientos, que han llevado a un progreso notable que ha transformado la vida de muchos pacientes (Howlader et al., 2020).

Por otro lado, las medidas de salud pública para reducir las tasas de tabaquismo han contribuido a reducir la incidencia de cáncer de pulmón y, por tanto, a disminuir la mortalidad por esta causa en los países más desarrollados. La incidencia del cáncer de pulmón está disminuyendo dos veces más rápido en los hombres que en las mujeres, lo que refleja el retraso histórico en el inicio del consumo de tabaco y del cese del hábito fumador por parte de las mujeres. Sin embargo, los diagnósticos de nuevos casos de cáncer de pulmón siguen aumentando en los países de bajos ingresos, donde las iniciativas de salud pública para dejar de fumar se han rezagado y el acceso a la atención de la salud es escaso. Además, el cáncer de pulmón sigue siendo diagnosticado en personas que nunca han fumado.

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea con una amplia variedad de características clinicopatológicas que se clasifica generalmente, como de células no pequeñas (NSCLC) (85% del total de diagnósticos) o de células pequeñas SCLC (15% del total de diagnósticos). Dentro de la clasificación de NSCLC, el adenocarcinoma (AC) es el subtipo más común de cáncer de pulmón, seguido de carcinomas de células escamosas (SCC). La incidencia del carcinoma de células escamosas, que era la histología más común, ha disminuido sustancialmente debido en parte, a la reducción de las tasas de tabaquismo en los países desarrollados y los cambios en la composición de los cigarrillos.

La subclasificación histológica precisa de NSCL es crucial, porque los enfoques terapéuticos dependen del tipo histológico. La última revisión de la clasificación de neoplasias pulmonares de la OMS incluye pautas sobre la terminología y el procedimiento a seguir para clasificar las neoplasias pulmonares en biopsias pequeñas, y recomienda el análisis inmunohistoquímico cuando sea posible. Por ejemplo, los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el agente antifolato pemetrexed son tratamientos útiles recomendados para el tratamiento de AC pero no de SCC. Además, las mutaciones de EGFR y las fusiones de genes, incluidas ALK y ROS1, están presentes casi exclusivamente en las formas de cáncer no escamoso. Por otro lado, los pacientes con AC que

poseen el gen de fusión EML4-ALK (quinasa de linfoma anaplásico 4, similar a la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo) o mutaciones que activan el gen EGFR, pueden responder a sus respectivos inhibidores de la tirosina-quinasa. Por otra parte, los pacientes con SCC no deben ser tratados con el factor de crecimiento endotelial antivascolar, bevacizumab, ya que, en ellos, frecuentemente produce hemorragia pulmonar.

La identificación de nuevos objetivos terapéuticos significa que las muestras de tejido se utilizan no solo para el diagnóstico, sino también para tinción inmunohistoquímica y para pruebas moleculares en relación con la terapia potencial. Esto es particularmente desafiante cuando las biopsias pequeñas o los frotis de citología son el único material disponible, como en el 70% de los pacientes con cáncer de pulmón con enfermedad avanzada y neoplasias inoperables en el momento del diagnóstico. Estos desafíos llevaron a nuevas propuestas de clasificación para muestras no resecadas, biopsias y citología, incluyendo la clasificación de adenocarcinoma de pulmón de ASLC/ATS/ERS y la última revisión de la clasificación de cáncer de pulmón de la OMS, que incluye la necesidad de técnicas auxiliares como la inmunohistoquímica. Con la aplicación de estas técnicas, el diagnóstico preciso de AC o SCC puede mejorar del 50-70% a más del 90% (Travis et al., 2013) (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015).

La búsqueda de nuevos marcadores para diferenciar con precisión entre muestras de AC y SCC es, por lo tanto, de gran relevancia clínica.

Nuestro grupo ha puesto de manifiesto en publicaciones previas que las secuencias de genes correspondientes a las proteínas relacionadas con la placa desmosomal placofilina 1 (PKP1), desmogleína 3 (DSG3) y queratina 15 (KRT15) se expresan diferencialmente en AC y SCC primarios de pulmón (Sanchez-Palencia et al., 2011). Posteriormente, también describimos la localización de estas proteínas en núcleo, citoplasma y membrana celular en estos tumores y propusimos la utilización de estas proteínas como marcadores inmunohistoquímicos (Gómez-Morales et al., 2013).

La inmunohistoquímica se utiliza ampliamente para la subtipificación de los carcinomas de pulmón. El factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) y Napsina A se consideran los marcadores más útiles para el diagnóstico de AC, y la evaluación del primero se considera más fácil porque es un marcador nuclear. Aunque la citoqueratina 7 (CK7) también se ha utilizado como marcador de AC, su utilidad no está universalmente aceptada. La citoqueratina 5/6 (CK 5/6), p63 y p40 son marcadores recomendados para SCC, mientras que DSG3 y desmocolina 3 también han surgido como posibles marcadores de SCC, aunque su utilidad clínica no se ha establecido todavía (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de la eficacia de estos marcadores, numerosos casos confirmados de carcinoma de pulmón son positivos tanto para los marcadores considerados característicos de AC como para los marcadores de SCC (doble positivos) o negativos para uno u otro tipo de marcadores. Dada la implicación terapéutica que tiene en la actualidad la distinción de estos dos tipos de carcinomas, los requisitos para la clasificación histológica del cáncer de pulmón son mucho más estrictos y existe una necesidad urgente de un panel de anticuerpos específico que diferencie claramente AC de SCC. Especialmente relevante es el desafío que presentan los tumores pobremente diferenciados y las muestras con artefactos técnicos que se encuentran con frecuencia en las muestras de biopsia pequeñas, que son por otro lado, las únicas muestras de tejido disponibles en pacientes en estadios avanzados.

Por todo lo expuesto, en nuestro trabajo se ha pretendido estudiar nuevos marcadores que mejoren el diagnóstico diferencial en muestras de AC y SCC y que puedan, además, ser predictores de pronóstico.

Los objetivos que se han desarrollado en el presente estudio han sido:

Generales:

- 1) Comparar la utilidad de seis marcadores convencionales y tres nuevos para el diagnóstico diferencial de SCC y AC de pulmón en muestras de biopsia pequeñas.
- 2) Explorar las correlaciones entre la expresión de estos marcadores y los datos histológicos y clínicos de los pacientes.

Específicos:

- 1) Estudiar la validez y fiabilidad de los marcadores convencionales utilizados hasta el momento en el diagnóstico diferencial de AC y SCC.
  - 1.1. Determinación de sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos y porcentaje de verdaderos negativos, exactitud, estadístico J de Youden y razones de verosimilitud (LR+ y LR-) para marcadores convencionales en AC.
  - 1.2. Determinación de sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos y porcentaje de verdaderos negativos, exactitud, estadístico J de

Youden y razones de verosimilitud (LR+ y LR-) para marcadores convencionales en SCC.

- 2) Estudiar la validez y fiabilidad de nuevos marcadores en el diagnóstico diferencial de AC y SCC.
  - 2.1. Análisis de la localización en núcleo, citoplasma o membrana para los nuevos marcadores propuestos.
  - 2.2. Determinación de sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos y porcentaje de verdaderos negativos, exactitud, estadístico J de Youden y razones de verosimilitud (LR+ y LR-) para los nuevos marcadores propuestos.
- 3) Analizar la posible utilización de combinación de marcadores para un mejor diagnóstico diferencial entre AC y SCC.
- 4) Analizar la exactitud diagnóstica de los marcadores propuestos para un mejor diagnóstico diferencial entre AC y SCC mediante las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) y análisis del área bajo la curva (AUC).
- 5) Elaboración de un modelo de regresión logística multivariante por pasos para determinar el panel de marcadores inmunohistoquímicos óptimo para diferenciar entre SCC y AC
- 6) Establecer la existencia de relaciones entre los nuevos marcadores propuestos y el grado de diferenciación de las muestras y las características clínicas de los pacientes.
- 7) Determinar la relación de los nuevos marcadores propuestos con la supervivencia de los pacientes.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 2.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS

Los pacientes que se incluyeron en el presente estudio fueron diagnosticados de NSCLC y seleccionados para cirugía. Los criterios utilizados para la inclusión, exclusión de los pacientes en el estudio fueron:

### Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de carcinoma de pulmón NSCLC
- Pacientes no sometidos a tratamientos previos quimioterápicos o radioterápicos
- Pacientes con capacidad para tolerar la cirugía de resección pulmonar (a continuación, se describe la valoración específica pulmonar antes de la intervención quirúrgica)

### Criterios de exclusión

- No se confirmó la existencia de carcinoma de pulmón
- Pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas, SCLC
- Pacientes con carcinoma de pulmón indiferenciado de células grandes
- Pacientes con carcinoma mesenquimal de origen pulmonar
- Pacientes con carcinoma de pulmón sarcomatoide
- Porcentaje de células tumorales en la muestra <50 %

Con el fin de determinar la capacidad de los pacientes para tolerar la cirugía de resección pulmonar, se sometieron a una valoración específica pulmonar de acuerdo con los protocolos de (Camínero Luna et al., 1998). Se realizó una gasometría arterial, una exploración funcional respiratoria y, los parámetros funcionales más importantes indicadores de una evolución postoperatoria complicada fueron: volumen espirado en el primer segundo (FEV1) y la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO). En casos dudosos se realizó un test de ejercicio cardiopulmonar.

Todas las muestras utilizadas en el presente estudio se obtuvieron en el centro de referencia para el área sanitaria de Andalucía Oriental, en el servicio de Cirugía torácica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves del Servicio Andaluz de Salud (SAS). La unidad de referencia correspondiente incluye las provincias de Granada, Almería y sur de Jaén (zona sanitaria de Alcalá la Real).

Las muestras utilizadas en este estudio procedían de 87 pacientes sometidos a una resección quirúrgica por cáncer de pulmón con fines curativos. Tras la información verbal y por escrito del diagnóstico y del procedimiento quirúrgico a realizar, se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes,

permitiendo la toma de muestras en el proceso quirúrgico con fines de análisis y estudio de investigación en cáncer de pulmón. El consentimiento firmado fue valorado y aprobado por el Comité ético del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada (Anexo 1). El protocolo del estudio cumplió con la Declaración de Helsinki de 1975 revisada en 1983.

Tras la resección quirúrgica y el alta hospitalaria los pacientes se incluyeron en un sistema de seguimiento y revisión de posibles complicaciones y/o recidiva tumoral, con revisión al mes tras el alta hospitalaria y posteriores revisiones cada 3 meses en el primer año. Posteriormente, las revisiones se realizaron cada 6 meses durante los primeros 5 años y una vez al año a partir del quinto año. Las revisiones incluían estudio radiológico de tórax y analítica de sangre. En la revisión del primer año se incluía tomografía axial computerizada de tórax y hemiabdomen superior.

## 2.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las muestras se obtuvieron en los primeros quince minutos después de la extracción quirúrgica de la pieza de tumor, las zonas de necrosis fueron evitadas. El tumor se seccionó longitudinalmente por su parte más voluminosa y consistente a la palpación. Las muestras se obtuvieron por biopsia incisional de  $\leq 0,4$  cm y fueron divididas en dos partes, una mitad fue utilizada para la extracción de ARN y estudios de expresión génica del tumor que ya han sido publicados previamente (Sanchez-Palencia et al., 2011b). La otra mitad se sometió a análisis histológico siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Inmediatamente después de la extracción de la muestra tumoral se obtiene una muestra de tejido pulmonar sano de zona alejada del tumor, de aproximadamente el mismo tamaño que la de muestra tumoral, esta muestra fue también dividida en dos mitades, una para estudios de expresión génica del tumor que ya han sido publicados previamente (Sanchez-Palencia et al., 2011b) y la otra mitad se sometió a análisis histológico siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- Fijación en formol tamponado al 4%
- Tallado
- Inclusión de la totalidad del fragmento en parafina utilizando un procesador automático de tejidos (Thermo Scientific modelo Excelsior AS)
- Confección de los bloques de parafina (Dispensador de parafina, Thermo Scientific modelo Histostar).

- Obtención de secciones (Microtomo Thermo Scientific modelo Microm HM 355S) a partir del bloque de parafina, de 3 ó 4 micras de grosor y montaje de las mismas sobre portas previamente tratados.
- Tinción de hematoxilina-eosina de control (Teñidora Thermo Scientific modelo Geminis AS)
- Deshidratación y aclarado.
- Montaje (Montadora de portas, Thermo Scientific modelo Clearuve)
- Examen histológico por dos patólogas de referencia.

Las características histológicas y clínicas de las muestras y los pacientes se indicarán en la sección correspondiente a resultados.

Las biopsias incisionales fueron analizadas por dos patólogas de referencia y siempre las mismas. Una vez confirmado el diagnóstico de carcinoma de pulmón de células no pequeñas mediante tinción de hematoxilina-eosina, se cuantificó el porcentaje de células tumorales, seleccionándose aquellas muestras con un porcentaje de células tumorales  $\geq 50$  %. Las muestras correspondientes a tejido pulmonar sano se analizaron detalladamente y se descartó la existencia de células tumorales.

El diagnóstico histológico de las muestras siguió las recomendaciones de la clasificación de la Organización mundial de la salud (OMS, WHO) 2015 (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2015b), este diagnóstico se basó en la morfología de la muestra utilizándose técnicas auxiliares, principalmente inmunohistoquímicas, cuando fue necesario.

Las muestras analizadas en este estudio se catalogaron de la siguiente forma:

#### Tipo tumoral

- Cáncer escamoso de pulmón en aquellos casos en los que estaba presente queratinización y/o puentes intercelulares
- Adenocarcinoma de pulmón en aquellos casos que presentaban diferenciación glandular y/o producción de mucina incluyendo patrones de crecimiento acinar, papilar, lepidico o sólido.

#### Grado de diferenciación

- En cáncer escamoso de pulmón:
  - Bien diferenciado cuando se observaba queratinización y/o puentes intercelulares en más del 75 % de la muestra tumoral.

- Moderadamente diferenciado cuando se observaba queratinización y/o puentes intercelulares en el 25-75 % de la muestra tumoral.
  - Poco diferenciado cuando se observaba queratinización y/o puentes intercelulares en menos del 25 %.
- En adenocarcinoma de pulmón:
- Bien diferenciado cuando se observaron glándulas en más del 75 % de la muestra tumoral.
  - Moderadamente diferenciado se observaron glándulas en el 25-75 % de la muestra tumoral.
  - Poco diferenciado se observaron glándulas en menos del 25 %.

En todos los casos se compararon los diagnósticos de las muestras de biopsia con los diagnósticos definitivos de las piezas quirúrgicas.

### 2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Con el fin de poder correlacionar los análisis anatomopatológicos de los tejidos tumorales con las características clínicas de los pacientes, se utilizaron las historias clínicas como fuente de información. Se elaboró una base de datos conteniendo todas las variables objeto de estudio. La evaluación y análisis de esta información se llevó a cabo en formato papel o digital según los registros. El sistema "Diraya Estación médica" permitió analizar los registros digitalmente a partir del año 2007.

Las variables recogidas en la base de datos fueron:

- Número y fecha de la biopsia
- Número de historia y de seguridad social
- Fecha de nacimiento. Edad
- Sexo
- Tabaquismo y número de cigarros/día
- EPOC
- Comorbilidad (hipertensión arterial, diabetes mellitus y enfermedades neumológicas relacionadas con el cáncer de pulmón).
- Tipo de tumor
- Tamaño tumoral (T)
- Afectación ganglionar (N)
- Existencia de metástasis (M)
- Estadío NSCLC

- Localización del tumor
- Grado de diferenciación en biopsia
- Diagnóstico clínico
- Porcentaje de células tumorales
- Estadíaje
- Supervivencia y meses de supervivencia
- Fecha del último informe
- Tinción inmunohistoquímica para los marcadores: CK 5/6; p40; TTF1; CK7; p63; Napsina A; PKP1 (núcleo, citoplasma, membrana); CK15 (núcleo, citoplasma, membrana); DSG3 (núcleo, citoplasma, membrana);

Antes del estudio, se revisaron todas las historias médicas y las secciones tumorales de las muestras quirúrgicas. La evaluación patológica de las muestras resecadas se llevó a cabo utilizando el sistema de estadificación de la revisión de 1997 del International System for Staging Lung Cancer (Sistema Internacional para la Estadificación del Cáncer de Pulmón) (Mountain, 1997) y se revisó de acuerdo con la edición más reciente (7.<sup>a</sup>) de la clasificación de tumores, ganglios y metástasis de la International Union Against Cancer (Unión Internacional contra el Cáncer) (UICC). Todos los especímenes fueron tumores primarios sin antecedentes de tratamiento que pudieran afectar los resultados inmunohistoquímicos.

#### 2.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Se llevó a cabo una puesta a punto de la técnica con el fin de determinar las diluciones óptimas para cada anticuerpo (Tabla 1). Como controles se utilizaron:

- Tejido de piel humana normal como control positivo para PKP1, KRT15 y DSG3
- Tejido pulmonar normal como control positivo para TTF1 y Napsina A
- Cáncer de mama como control positivo para CK7
- Cáncer escamoso de piel como control positivo para CK 5/6, p63 y p40
- Como controles negativos, se usaron los mismos controles positivos, reemplazando el anticuerpo primario con PBS.

El estudio se realizó en toda la serie mediante inmunotinción automática (LabVision Autostainer 480s Thermofisher) utilizando el sistema de detección Master Polymer Plus (MAD-000327QK Master Diagnostic) según el procedimiento siguiente:

A) Desparafinación e hidratación de las secciones. Procedimiento llevado a cabo progresivamente por inmersión en baños sucesivos a temperatura ambiente en el interior de una cámara de extracción de gases mediante:

- 3 baños de Xileno, durante 5 minutos
- 2 baños de etanol absoluto
- 1 baño de etanol al 80%, durante 1 minuto
- 1 baño de etanol al 70%, durante 1 minuto
- 1 baño de etanol al 30%, durante 1 minuto
- y finalmente un baño de agua destilada.

B) Bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos.

C) Desenmascaramiento antigénico llevado a cabo en de manera automática en un solo paso en Módulo PT (PT Module. Máster Diagnóstica, Granada, España). Las secciones se trataron con tampón citrato sódico pH 6,0

D) Incubación con el anticuerpo primario a 4 ° C durante 16 horas (Tabla 1)

E) Lavado con tampón fosfato salino (PBS) 3 veces durante 5 minutos cada vez

F) Incubación con el anticuerpo primario *Amplifier Quanto* (UltraVision Quanto) durante 10 minutos (Tabla 2.1)

G) Lavado e incubación durante 10 minutos con *Polymer Quanto* (UltraVision Quanto)

H) Se utilizó diaminobenzidina (DAB) como cromógeno

I) Las secciones se contrastaron con hematoxilina

J) Se visualizó al microscopio las secciones inmunoteñidas.

La tinción inmunohistoquímica fue evaluada de forma independiente por dos patólogas, quienes asignaron una puntuación basada en el grado y la intensidad de la inmunorreactividad. El acuerdo entre patólogas fue superior al 90% y cualquier diferencia en la interpretación de los resultados se resolvió por consenso.

La tinción para PKP1, CK15 y DSG3 se evaluó semicuantitativamente en el núcleo, el citoplasma y la membrana considerándose de acuerdo con el siguiente consenso:

#### Grado de inmunorreactividad

- Negativo. Se designó como 0. Se consideró negativo cuando el porcentaje de células teñidas fue <5 %.

- Positivo 1+: Cuando el porcentaje de células teñidas fue 6–25 %
- Positivo 2+: Cuando el porcentaje de células teñidas fue 26–50 %
- Positivo 3+: Cuando el porcentaje de células teñidas fue >50%

Intensidad de inmunorreactividad

La intensidad de la tinción, en las mismas localizaciones, se puntuó semicuantitativamente de 0 a 3.

Los resultados de la inmunotinción se puntuaron como la suma del grado y la intensidad de la inmunorreactividad, considerando una puntuación  $\geq 3$  positiva y una puntuación  $< 3$  negativa. En la valoración de TTF1, p63 y p40, solo los casos con tinción nuclear se consideraron positivos, mientras que sólo aquellos con tinción citoplasmática/membranosa se consideraron positivos para CK5/6 y CK7, y aquellos con tinción granular y citoplasmática característica se consideraron positivos para Napsina A.

Anticuerpo primario Dilución		Referencia
PKP1	HPA027221, Sigma. Policlonal de conejo (St Louis, MO, EE. UU)	1:200
KRT15	HPA024554, Sigma. Policlonal de conejo	1:500
DSG3	NB100-1643, Abcam. Monoclonal de ratón (Cambridge, Reino Unido)	1:200
TTF-1	000486QD, clon SPT24. Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido
NAPSINA A	001004QD, clon BS10. Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido
CK7	001004QD, clon OVTL 12/30. Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido
CK5/6	000680QD, clon EP24/EP67/B22-18B231. Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido
p63	000479QD clon 4 <sup>a</sup> . Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido

p40	000686QD, clon ZR8. Monoclonal (Master Diagnostica)	Anticuerpo prediluido
-----	---	-----------------------

Tabla 2.1.- Anticuerpos primarios utilizados en el estudio inmunohistoquímico.

## 2.5 MEDIDAS DE VALIDEZ EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Las medidas de validez son la sensibilidad y la especificidad, que son características inherentes a la prueba y dan como resultado valores estables y que realizan el análisis de los datos en tabla de valores 2x2 por columnas. Hay que tener en cuenta que según las condiciones de realización de la prueba, esta puede presentar distintos valores de sensibilidad y especificidad (Gómez González & Pérez Castán, 2007) (James et al., 2021).

La **sensibilidad** nos indica la probabilidad de que un enfermo (o una enfermedad presente en una muestra) sea identificada correctamente por la prueba, es decir que tenga un resultado positivo (enfermos con prueba positiva de entre todos los enfermos).

Este parámetro se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \text{ (positivos/total)}$$

Donde TP son los verdaderos positivos y FN son los falsos negativos.

El cálculo de porcentaje de verdaderos positivos (PTP) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{PTP} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \text{ (positivos/totales)}$$

Donde TP son los verdaderos positivos y FN son los falsos negativos

La **especificidad** nos indica la probabilidad de que la ausencia de enfermedad sea identificada correctamente por la prueba, es decir, que la prueba sea negativa (sanos con prueba negativa de entre todos los sanos).

Este parámetro se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \text{ (negativos/total)}$$

Donde TN son los verdaderos negativos y FP son los falsos positivos.

El cálculo de porcentaje de verdaderos negativos (PTN) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{PTN} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \text{ (negativos/total)}$$

Donde TN son los verdaderos negativos y FN son los falsos negativos.

## 2.6 MEDIDAS DE FIABILIDAD EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

La fiabilidad nos indica la reproducibilidad de la prueba y viene determinada por la proporción de falsos negativos y falsos positivos en la valoración (Gómez González & Pérez Castán, 2007) (James et al., 2021).

La proporción de falsos negativos, nos indica la probabilidad de que un enfermo o una muestra que contiene una determinada patología sea identificada incorrectamente por la prueba, de tal forma que se obtenga un resultado negativo (enfermos con prueba negativa de entre todos los enfermos).

La proporción de falsos positivos, nos indica la probabilidad de que un individuo, o una muestra, sin la enfermedad sea identificado incorrectamente por la prueba, de tal forma que se obtenga para ese enfermo o esa muestra una prueba positiva (sanos con prueba positiva de entre todos los sanos).

En general a la hora de elegir una prueba diagnóstica, una prueba sensible implica que cuando se aplica a un individuo (o muestra) determinado y es negativa se puede descartar con confianza que el individuo (muestra) contenga la enfermedad, ya que en ese caso hubiese dado positivo. Sin embargo, cuando la prueba es positiva no podemos asegurar que el individuo (muestra) esté enfermo, de tal forma, que algunos de los individuos (muestras) considerados inicialmente enfermos no tengan la enfermedad (falsos positivos).

Por el contrario, las pruebas muy específicas identificarán todos los individuos sanos, por lo tanto, un resultado positivo en la prueba indica con confianza que el individuo está enfermo. Sin embargo, cuando el resultado de la prueba es negativo, no podríamos asegurar que se tratase de un individuo sano, puesto que podría tratarse de un falso negativo. En las pruebas muy específicas encontraremos un número de falsos positivos elevado, esto determinará un sobrediagnóstico que obligará a la utilización de pruebas confirmatorias posteriormente (Gómez González & Pérez Castán, 2007) (James et al., 2021).

## 2.7 RAZONES DE VEROSIMILITUD O COCIENTE DE PROBABILIDAD (LR) (LIKELIHOOD RATIO)

Determinan cuánto es más probable un resultado positivo (negativo) en la prueba según la presencia o ausencia de la enfermedad, independientemente de la prevalencia de la enfermedad. Estos valores se relacionan con la sensibilidad y

especificidad, y se puede utilizar para la comparación de pruebas en un mismo diagnóstico (James et al., 2021).

Así  $LR^+$ , se refiere al cociente entre la probabilidad de que el resultado de la prueba sea positivo en pacientes enfermos y la probabilidad de que el resultado sea positivo en pacientes sanos.

Este parámetro se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$LR^+ = \text{Sensibilidad} / (1 - \text{Especificidad})$$

En cuanto al valor  $LR^-$ , se refiere al cociente entre la probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo en pacientes enfermos y la probabilidad de que el resultado sea negativo en pacientes sanos.

Este parámetro se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$LR^- = (1 - \text{Sensibilidad}) / \text{Especificidad}$$

## 2.8 ESTADÍSTICO J DE YOUTEN

Se refiere a la suma de la sensibilidad y especificidad menos la unidad.

Este parámetro se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$J \text{ Youden} = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

Una prueba diagnóstica debe tener un estadístico J de Youden mayor que 0. El valor 1 sería una prueba perfecta (ausencia de falsos positivos y ausencia de falsos negativos). En el caso de un estadístico J de Youden con valor 0 nos indica que la sensibilidad y la especificidad son complementarias y que hay la misma posibilidad de prueba positiva en el grupo de enfermos que no enfermos; por tanto, no es útil. En el caso de un estadístico J de Youden con valor menor que 0, entonces los resultados de la prueba diagnóstica deben intercambiarse (el resultado positivo es en realidad negativo y viceversa) (James et al., 2021).

## 2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos correspondientes a cada uno de los parámetros estudiados en el análisis histológico, características clínico-patológicas y el estudio inmunohistoquímico se recogieron en el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) en su versión 20.0. (IBM, Chicago IL).

En el caso de las variables cualitativas se realizó un análisis descriptivo, con medidas de tendencia central y de dispersión, y se obtuvo la distribución de frecuencias y porcentajes. Se llevó a cabo un análisis inferencial en el estudio de la relación entre las características clínico-patológicas de los pacientes y la expresión de los distintos marcadores, así como en los casos en los que se hizo un estudio de asociación entre las variables cualitativas entre sí. Se aplicó el método de Tablas de contingencia y se realizaron las pruebas de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test exacto de Fisher.

Se calcularon los índices de probabilidades con intervalos de confianza (IC) del 95 % para tablas de 2x2. Se calcularon las medidas de precisión para cada marcador con los IC del 95 % correspondientes.  $P \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Se ajustaron modelos de regresión logística para evaluar la capacidad de cada marcador o combinación de marcadores para predecir la clasificación de las muestras como AC o SCC y se construyeron curvas ROC en base a las predicciones generadas por cada modelo. En el análisis de las curvas ROC se utilizó el área bajo la curva (AUC) para evaluar y comparar la utilidad de los diferentes marcadores para la diferenciación entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso de pulmón.

Finalmente, se construyó un modelo de regresión logística multivariable paso a paso para determinar el panel de marcadores inmunohistoquímicos óptimo que permitiera la diferenciación entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso de pulmón.

Los análisis de supervivencia se realizaron con el software R 3.4.0, utilizando los paquetes 'survival' (v2.42-3) y 'survminer' (v0.4.2). La información clínica y los datos de expresión génica normalizados se descargaron de Firebrowse (v1.1.38; <http://firebrowse.org/>) para el proyecto TCGA-LUSC (n = 504). Los pacientes con SCC de la cohorte TCGA-LUSC se dividieron en dos grupos para el análisis de la relación entre los resultados de supervivencia y la expresión génica: "alto" (por encima de la mediana para el gen específico) y "bajo" (por debajo de la mediana). Se trazaron curvas de Kaplan-Meier para los datos de supervivencia sin procesar y luego se construyeron modelos de riesgos proporcionales de Cox, teniendo en cuenta el estadio del tumor y la edad y el sexo del paciente.

### 3. RESULTADOS

---

COPIA

### 3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los pacientes seleccionados para el presente estudio fueron intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (Servicio Andaluz de Salud, SAS). Todos los pacientes fueron diagnosticados de carcinoma de pulmón primario de células no pequeñas.

El presente estudio incluyó 85 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón realizado entre 2004 y 2015. La mayor parte de los pacientes fueron varones, con un total de 74 varones y 11 mujeres, como se refleja en la Figura 3.1, con una media de edad de 64 años y un rango de edad de 30 a 82 años.

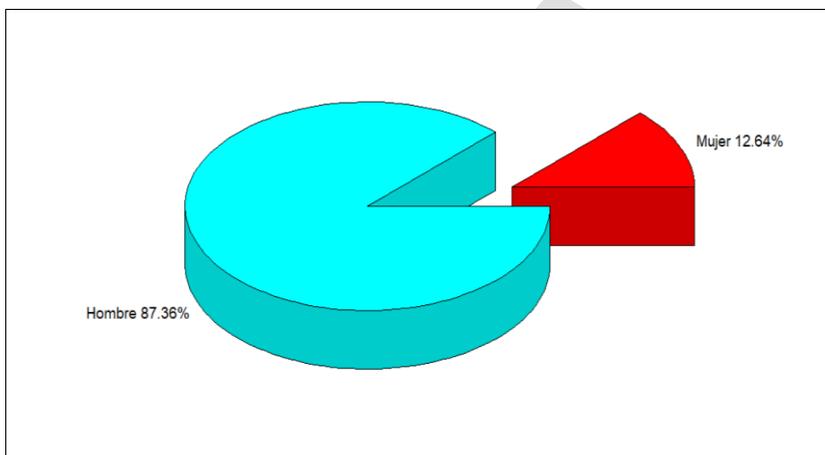


Figura 3.1. Distribución de pacientes NSCLC por sexo

En cuanto al consumo tabáquico, 27 pacientes eran fumadores, 44 exfumadores y 6 no fumadores (hubo 10 pacientes para los cuales no se registraron datos), como se refleja en la Figura 3.2. La media de cigarrros/día fue de 22,11.

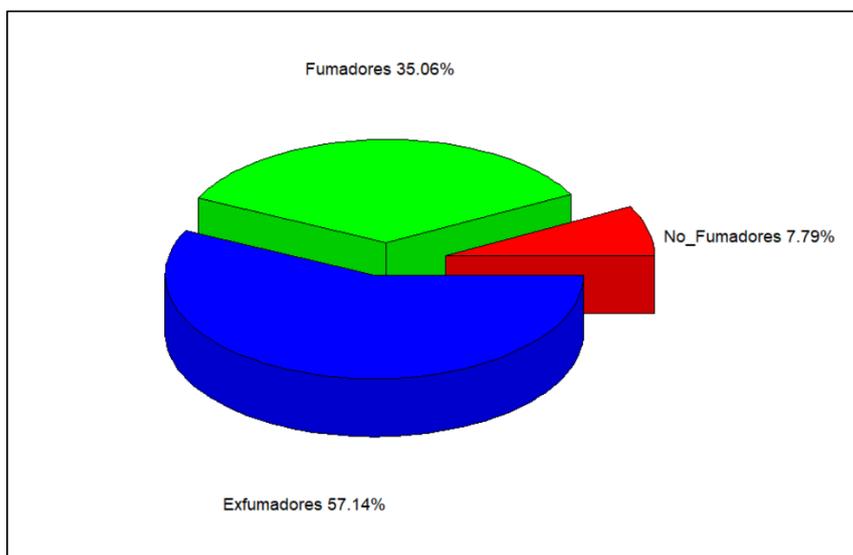


Figura 3.2. Distribución de pacientes NSCLC según consumo tabáquico

En cuanto a la estirpe histológica, un total de 41 pacientes fueron diagnosticados de adenocarcinoma mientras que 44 pacientes lo fueron de carcinoma escamoso. Según la 7ª edición TNM para el cáncer de pulmón, en relación con el estadio tumoral, 54 pacientes, se encontraron en estadio I, 18 pacientes, en estadio II, 10 pacientes, en estadio III y 3 pacientes, en estadio IV. Solo se incluyeron los casos en los que el diagnóstico histológico de la pieza reseçada fue cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y de estos se consideraron para el estudio los casos de adenocarcinoma (AC) o cáncer escamoso (SCC) invasivo, lo que representa la mayoría de la serie (85 pacientes). Hubo dos casos que correspondían a carcinomas sarcomatoides que fueron excluidos del estudio. En cuanto al grado de diferenciación de la muestra en 34 pacientes (39,08%) fue pobremente diferenciado, en 37 pacientes fue moderadamente diferenciado (42,52%) y en 8 pacientes fue bien diferenciado (9,19%).

En cuanto al parámetro descriptor T, la mayor parte de los pacientes se encontraron en T1: 10 pacientes (11,49 %) y T2: 56 pacientes (64,36%). La media de tamaño tumoral fue 5,021 cm. Con respecto al parámetro descriptor N, la mayor parte de los pacientes correspondieron a N0: 64 pacientes (73,56%). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) estuvo presente en 37 pacientes (42,52%). La hipertensión arterial (HTA) fue la comorbilidad más frecuente.

En la tabla 3.1 se resumen las variables descriptoras correspondientes a los pacientes seleccionados para el estudio.

Variable	Paciente NSCLC n=85(87)
Sexo n (%)	
Mujer	11(12,94)
Hombre	74(87,06)
Edad, años media (rango)	64(30-82)
Hábito tabáquico n (%)	
Fumador	27(31,03)
Exfumador	44(50,57)
No fumador	6(6,89)
Media cigarros/día	22,11
Tipo histológico	
Adenocarcinoma	41(47,12)
Carcinoma escamoso	44(50,57)
Estadio tumoral	
Estadio I	54(63,52)
Estadio II	18(21,17)
Estadio III	10(11,76)
Estadio IV	3(3,53)

Tabla 3.1.- Datos clínicos de los pacientes analizados en el presente estudio

### 3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CONVENCIONALES

Se analizó la tinción inmunohistoquímica de seis marcadores bien documentados, considerados convencionalmente de utilidad para el diagnóstico diferencial de SCC y AC y utilizados de forma rutinaria por muchos laboratorios de histopatología (Mukhopadhyay & Katzenstein, 2011b; Tacha D, Yu CH, Haas T, 2011a; Tacha D, Zhou D, Henshall-Powell RL, 2010a; Terry et al., 2010b). CK5/6, p40 y p63 se consideran marcadores de SCC, mientras que CK7, TTF1 y Napsina A se consideran marcadores de AC. (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6).

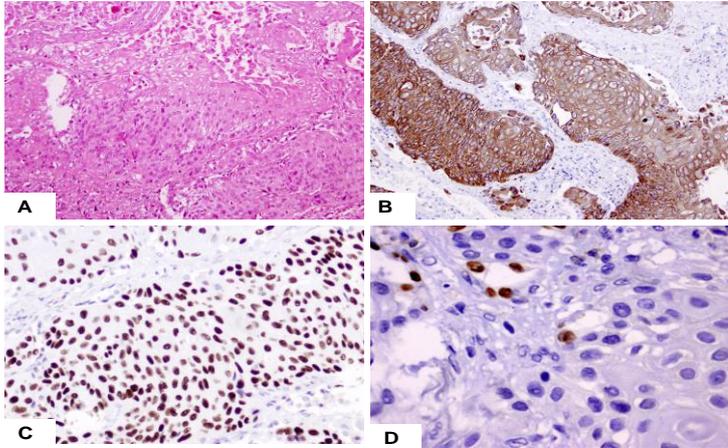


Figura 3.3.- Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, de uno de los pacientes objeto de estudio, con queratinización individual (A), con intensa positividad para CK 5/6 y p40 (B y C) y negatividad para TTF-1 (D), que se observa sólo en las células nativas atrapadas por la neoplasia (H-E 10x; tinciones inmunohistoquímicas 10x, 20x y 20x).

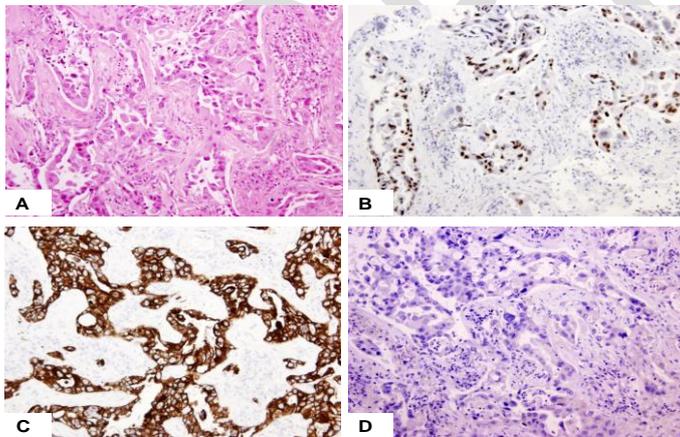


Figura 3.4. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado en otro paciente estudio. Se observan espacios glandulares irregulares revestidos por células tumorales atípicas y separadas por estroma fibroso (A). Inmunohistoquímica positiva para TTF-1 (B) CK 7 (C); la tinción para p40 es negativa (Tinciones H-E e inmunohistoquímicas 10x)

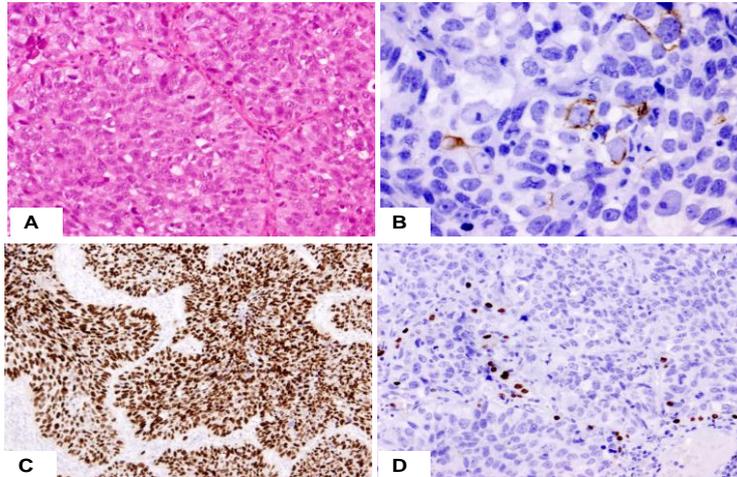


Figura 3.5. Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado. Células grandes eosinófilas con atipicidad nuclear y presencia de varias figuras de mitosis y ausencia de queratinización (A). Expresión irregular de CK 5/6 (B), fuerte positividad nuclear para p63 (C) y ausencia de positividad para TTF-1 que solo está presente, sin embargo, en células nativas del pulmón, atrapadas entre las células neoplásicas (D). (Tinción H-E 20x, tinciones inmunohistoquímicas 40x, 10x y 10x en B, C y D).

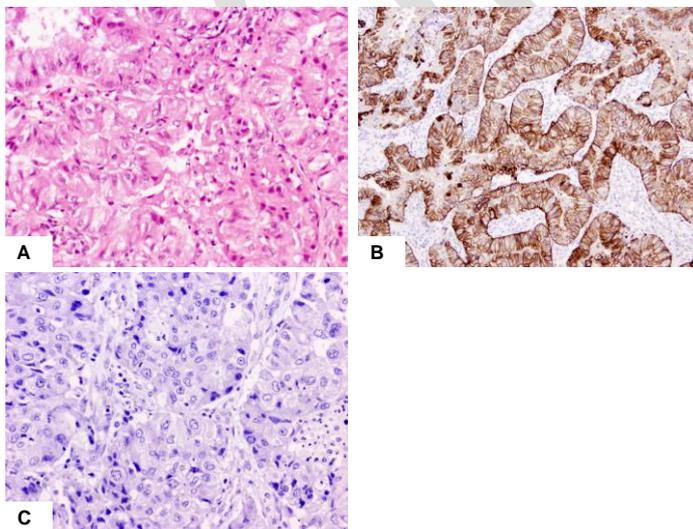


Figura 3.6. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (A); positividad inmunohistoquímica para CK7 (B) y negatividad para p40 (C). (Todas las tinciones 20x).

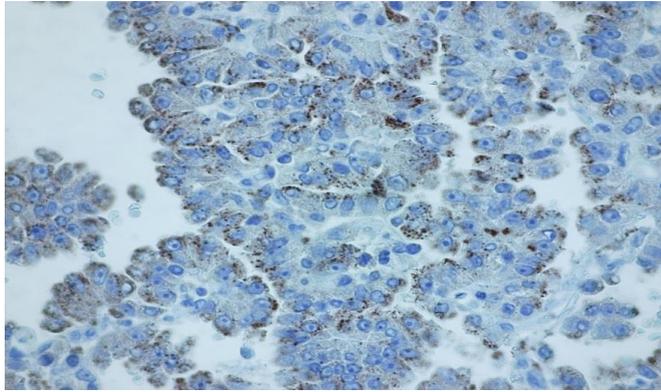


Figura 3.7. Adenocarcinoma con patrón papilar con positividad para Napsina A. Obsérvese el patrón granular característico. Inmunohistoquímica 60x.

En nuestra cohorte de 85 pacientes, el marcador convencional más sensible para AC fue CK7 (97,6 %, con 2,4 % de falsos negativos), seguido de Napsina A (80,5 %, con 19,5 % de falsos negativos) y TTF1 (75 %, con 25 % de falsos negativos). Sin embargo, el marcador más específico fue TTF1 (97,7 %), seguido de Napsina A (93,2 %) y CK7 (56,8 %).

Cuando se utilizó el marcador TTF1, obtuvimos 96,8 % de verdaderos positivos y 81,1 % de verdaderos negativos, seguido de Napsina A (91,7 % de verdaderos positivos y 83,7 % de verdaderos negativos) y CK7 (67,8 % de verdaderos positivos y 96,2 % de verdaderos negativos). La prueba fue más precisa para Napsina A (87,1 %), seguida de TTF1 (86,9 %) y CK7 (76,5 %); además, el estadístico J de Youden fue mayor para Napsina A (0,74), seguido de TTF1 (0,73) y CK7 (0,54) (Tabla 3.2).

En el caso de SCC, el marcador convencional más sensible fue p63 (95,5 %), seguido de CK5/6 (93,2 %) y p40 (88,6 %), mientras que p40 fue el más específico (95,1 %), seguido de CK5/6 (92,7 %) y p63 (85,4 %).

Cuando se utilizó el marcador p40 obtuvimos 95,1 % de verdaderos positivos y 88,6 % de verdaderos negativos, seguido de CK 5/6 (93,2 % de verdaderos positivos y 92,7 % de verdaderos negativos) y p63 (87,5 % de verdaderos positivos y 94,6 % de verdaderos negativos). La prueba fue más precisa para CK 5/6 (92,9 %), seguida de p40 (91,8 %) y p63 (90,6 %), mientras que el estadístico J de Youden fue más alto para CK 5/6 (0,85), seguido de p40 (0,84 %) y p63 (0,81). (Tabla 3.3).

	ADENOCARCINOMA		
	CK7	TTF1	Napsina A
<b>Sensibilidad (%)</b>	97.6	75	80.5
<b>(Positivo/Total)</b>	(40/41)	(30/40)	(33/41)
<b>Especificidad (%)</b>	56.8	97.7	93.2
<b>(Negativo/Total)</b>	(25/44)	(43/44)	(41/44)
<b>Porcentaje de verdaderos positivos (PTP) (%)</b>	67.8	96.8	91.7
<b>(Positivos/Total)</b>	(40/59)	(30/31)	(33/36)
<b>Porcentaje de verdaderos negativos (PTN) (%)</b>	96.2	81.1	83.7
<b>(Negativos/Total)</b>	(25/26)	(43/53)	(41/49)
<b>Exactitud (Accuracy) (%)</b>	76.5	86.9	87.1
<b>(Positivo/Total)</b>	(65/85)	(73/84)	(74/85)
<b>Estadístico J de Youden</b>	0.54	0.73	0.74
<b>LR+ (Likelihood Ratio). Razón de verosimilitud</b>	2.26	32.61	11.84
<b>LR- (Likelihood ratio). Razón de verosimilitud</b>	0.04	0.26	0.21

Tabla 3.2. Expresión de marcadores convencionales. Sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos (PTP) y porcentaje de verdaderos negativos (PTN), exactitud (accuracy), estadístico J de Youden y valores de razón de verosimilitud positiva y negativa para la tinción con marcadores utilizados convencionalmente para el diagnóstico diferencial de AC (CK7, TTF1 y Napsina A).

Sensibilidad,  $TP/(TP+FN)$ ; Especificidad,  $TN/(TN+FP)$ ; PTP,  $TP/(TP+FN)$ ; PTN,  $TN/(TN+FP)$ ; Exactitud (Accuracy),  $(TP+TN)/(TP+FP+FN+TN)$ ; estadístico J de Youden,  $Sensibilidad+Especificidad-1$ ; Razón de verosimilitud positiva (LR+),  $Sensibilidad/(1-Especificidad)$ ; Razón de verosimilitud negativa (LR-),  $(1-Sensibilidad)/Especificidad$ .

**SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

	<b>CK5/6</b>	<b>p40</b>	<b>p63</b>
<b>Sensibilidad (%)</b>	93.2	88.6	95.5
<b>(Positivo/Total)</b>	(41/44)	(39/44)	(42/44)
<b>Especificidad (%)</b>	92.7	95.1	85.4
<b>(Negativo/Total)</b>	(38/41)	(39/41)	(35/41)
<b>Porcentaje de verdaderos positivos (PTP) (%)</b>	93.2	95.1	87.5
<b>(Positivos/Total)</b>	(41/44)	(39/41)	(42/48)
<b>Porcentaje de verdaderos negativos (PTN) (%)</b>	92.7	88.6	94.6
<b>(Negativos/Total)</b>	(38/41)	(39/44)	(35/37)
<b>Exactitud (Accuracy) (%)</b>	92.9	91.8	90.6
<b>(Positivo/Total)</b>	(79/85)	(78/85)	(77/85)
<b>Estadístico J de Youden</b>	0.85	0.84	0.81
<b>LR+ (Likelihood Ratio). Razón de verosimilitud</b>	12.64	18.08	6.54
<b>LR- (Likelihood ratio). Razón de verosimilitud</b>	0.08	0.12	0.05

Tabla 3.3. Expresión de marcadores convencionales. Sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos (PTP) y porcentaje de verdaderos negativos (PTN), exactitud (accuracy), estadístico J de Youden y valores de razón de verosimilitud positiva y negativa para la tinción con marcadores utilizados convencionalmente para el diagnóstico diferencial de SCC (CK5/6, p40 y p63).

Sensibilidad,  $TP/(TP+FN)$ ; Especificidad,  $TN/(TN+FP)$ ; PTP,  $TP/(TP+FN)$ ; PTN,  $TN/(TN+FP)$ ; Exactitud (Accuracy),  $(TP+TN)/(TP+FP+FN+TN)$ ; estadístico J de Youden,  $Sensibilidad+Especificidad-1$ ; Razón de verosimilitud positiva (LR+),  $Sensibilidad/(1-Especificidad)$ ; Razón de verosimilitud negativa (LR-),  $(1-Sensibilidad)/Especificidad$ .

Entre los marcadores convencionales para AC (CK7, TTF1 y Napsina A) y SCC (CK 5/6, p40 y p63) analizados en nuestra cohorte de pacientes, solo TTF1 en AC y p40 en SCC fueron específicos en  $\geq 94$  % de las muestras, con  $\geq 94$  % de verdaderos positivos.

### 3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES PARA SCC

Con el objetivo de mejorar el diagnóstico en cáncer de pulmón se estudiaron a continuación tres marcadores nuevos para SCC relacionados con los desmosomas PKP1, KRT15 y DSG3 que pueden contribuir al diagnóstico diferencial de SCC y AC. Se analizó su localización en núcleo, citoplasma o membrana.

En el caso del marcador PKP1 la tinción inmunohistoquímica se detectó principalmente en SCC, con una distribución e intensidad heterogénea entre los diferentes tumores analizados, y en diferentes áreas de una misma neoplasia. PKP1 tiñó con mayor frecuencia las membranas celulares, marcando las uniones intercelulares, también se observó tinción del citoplasma con una frecuencia inferior a la tinción de membrana. La tinción membranosa se observó principalmente en áreas bien o moderadamente diferenciadas de SCC. En cuanto a la tinción nuclear, esta se observó con menos frecuencia y fue más frecuente en las células con un aspecto más inmaduro (Figura 3.8).

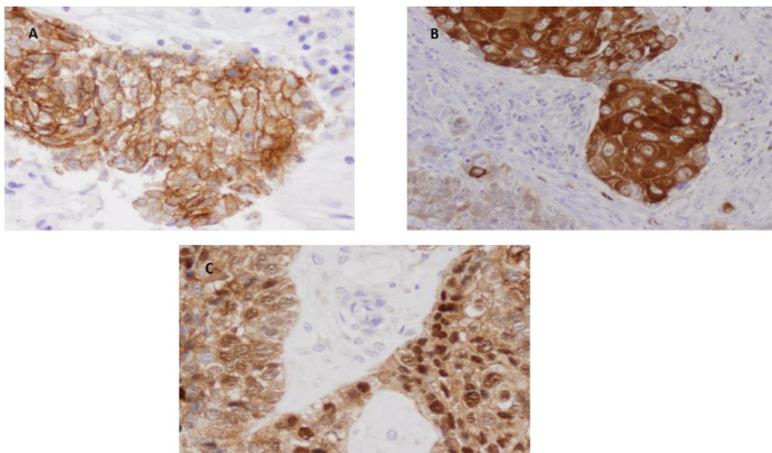


Figura 3.8. Tinción inmunohistoquímica de PKP1 en SCC. A) Tinción predominante en membrana celular a (40x). B) Tinción positiva en membrana y citoplasma. Obsérvese la tinción débil en el área menos diferenciada (abajo a la izquierda) (20x). C) Tinción nuclear (40x)

Nunca se observó tinción membranosa en AC, aunque ocasionalmente se observó tinción focal en núcleo y citoplasma como se refleja en la Figura 3.9.

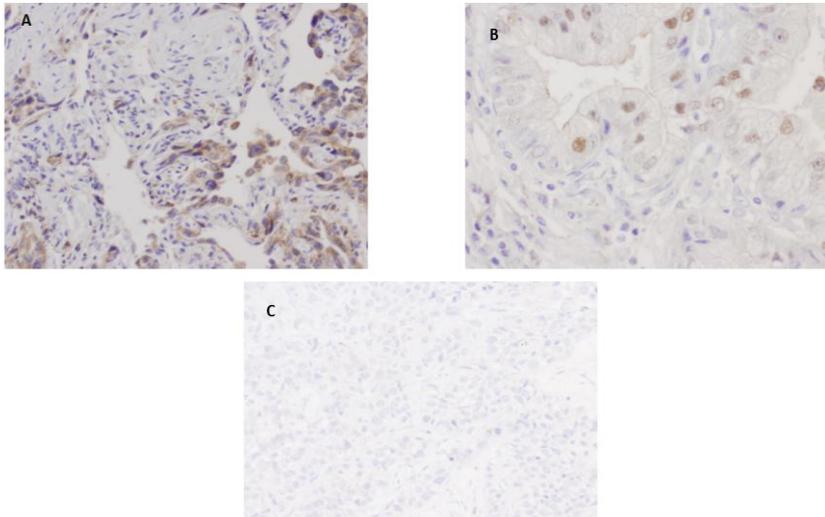


Figura 3.9. Tinción inmunohistoquímica de PKP1 en AC. A y B) Tinción citoplasmática y nuclear débil (40x). C) AC pobremente diferenciado con tinción completamente negativa (10x).

En relación con el marcador KRT15 también se restringió principalmente a SCC tal y como se observa en la Figura 3.10, con una distribución e intensidad variable entre diferentes SCC y entre diferentes áreas de la misma neoplasia. La tinción en SCC se observó así mismo, en áreas mejor diferenciadas, principalmente en la membrana celular pero también en el citoplasma. La tinción nuclear se observó con menos frecuencia que con PKP1 y se observó en células ocasionales con apariencia menos diferenciada reflejado en la Figura 3.10 D. En las muestras de AC, no se observó tinción para KRT15 en la membrana celular, en cuanto a la tinción nuclear y citoplasmática para este marcador solo estuvo presente ocasionalmente. En cuanto a la tinción citoplasmática para KRT15 en muestras de AC estuvo presente en 2 muestras siendo en ambas sólo levemente positivo, (Positivo 1+, con un porcentaje de células teñidas de 6-25 %). En cuanto a la tinción nuclear para KRT15 en muestras de AC estuvo presente en 10 muestras siendo en 7 de ellas sólo levemente positivo, (Positivo 1+, con un porcentaje de células teñidas de 6-25 %), tal y como se observa en la Figura 3.11.

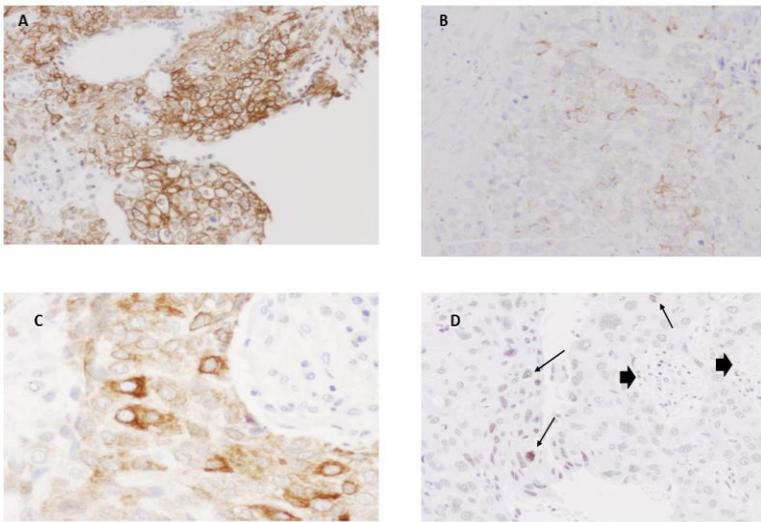


Figura 3.10. Tinción Inmunohistoquímica para KRT15 en SCC. A) Extensamente positiva en membranas celulares de muestras de SCC bien diferenciado (20x). B) Área poco diferenciada con tinción membranosa focal (20x). C) Área con tinción citoplasmática predominante (60x) D) SCC pobremente diferenciado que muestra algunos núcleos con tinción tenue (flechas). Nótese la negatividad en las células del estroma (puntas de flecha) (20x).

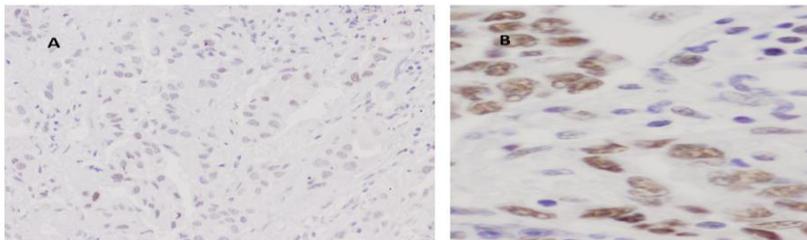


Figura 3.11. Tinción Inmunohistoquímica para KRT15 en AC. Positividad nuclear débil (A) y moderada (B) en ocasionales células (20x y 40x).

En muestras de SCC la tinción para DSG3 mostró una distribución irregular y semejante a las tinciones observadas para los marcadores PKP1 y KRT15 ya que se encontró con mayor frecuencia en membranas celulares de las áreas mejor diferenciadas y, en menor grado, en citoplasma. En cuanto a la tinción nuclear, fue mucho menos frecuente y se observó principalmente en áreas poco

diferenciadas, dicha tinción nuclear estuvo presente en 7 muestras siendo en 6 de ellas sólo levemente positivo, (Positivo 1+, con un porcentaje de células teñidas de 6-25 %). (Figura 3.12). No se observó tinción para DSG3 en AC con la excepción de solo 4 muestras siendo 2 de ellas sólo levemente positivo, (Positivo 1+, con un porcentaje de células teñidas de 6-25 %).

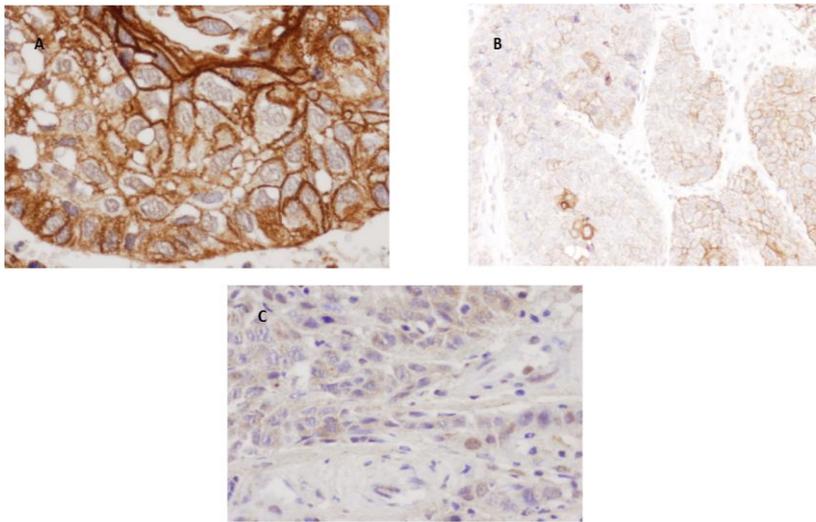


Figura 3.12. Tinción inmunohistoquímica de DSG3 en SCC. A) SCC bien diferenciado con intensa positividad principalmente en membranas celulares (40x) B) Tinción más heterogénea en membranas celulares y algunos citoplasmas (20x). C) Débil tinción citoplasmática/nuclear en área poco diferenciada (40x).

En nuestra cohorte, el marcador más sensible fue PKP1 en núcleo (86 %), seguido de KRT15 en membrana (75,6 %) y DSG3 en membrana (64,3 %). Sin embargo, DSG3 en membrana fue el más específico (100 %), seguido de PKP1 en membrana (97,4 %) y KRT15 en membrana (94,6 %).

Con DSG3, la mayor tasa de verdaderos positivos y verdaderos negativos correspondió a la tinción membranosa (100 % de verdaderos positivos y 72,2 % de verdaderos negativos). Con PKP1, la tasa de verdaderos positivos más alta fue para la tinción membranosa (97,1 %) y la tasa de verdaderos negativos más alta se observó para la tinción citoplasmática (84,2 %). En el caso del marcador KRT15, las tasas más altas de verdaderos positivos y verdaderos negativos fueron para la tinción membranosa (93,9 % de verdaderos positivos y 77,8 % de verdaderos negativos). La prueba fue más precisa en la tinción de PKP1 en membrana (86,6 %), seguida de KRT15 en membrana (84,6 %) y DSG3 en membrana (81,5 %). El estadístico J de Youden fue más alto con PKP1 en membrana (0.74), seguido de KRT15 en membrana (0.70) y DSG3 en membrana (0.643). Todos los datos comentados se reflejan en la Tabla 3.4.

SQUAMOUS CELL CARCINOMA									
	PKP1			KRT15			DSG3		
	Nucleus	Cytoplasm	Membrane	Nucleus	Cytoplasm	Membrane	Nucleus	Cytoplasm	Membrane
<b>Sensibilidad (%)</b>	72.1	86	76.7	19.5	73.2	75.6	16.7	61.9	64.3
<b>(Positivos/Total)</b>	(31/43)	(37/43)	(33/43)	(8/41)	(30/41)	(31/41)	(7/42)	(26/42)	(27/42)
<b>Specificidad (%)</b>	92.3	82.1	97.4	73	94.6	94.6	89.7	94.9	100
<b>(Negativos/Total)</b>	(36/39)	(32/39)	(38/39)	(27/37)	(35/37)	(35/37)	(35/39)	(37/39)	(39/39)
<b>Porcentaje de verdaderos positivos (PTP) (%)</b>	91.2	84.1	97.1	44.4	93.8	93.9	63.6	92.9	100
<b>(Positivos/Total)</b>	(31/34)	(37/44)	(33/34)	(8/18)	(30/32)	(31/33)	(7/11)	(26/28)	(27/27)
<b>Porcentaje de verdaderos negativos (PTN) (%)</b>	75	84.2	79.2	45	76.1	77.8	50	69.8	72.2
<b>(Negativos/Total)</b>	(36/48)	(32/38)	(38/48)	(27/60)	(35/46)	(35/45)	(35/70)	(37/53)	(39/54)
<b>Exactitud (%)</b>	81.7	84.1	86.6	44.9	83.3	84.6	51.9	77.8	81.5
<b>(Positivos/Total)</b>	(67/82)	(69/82)	(71/82)	(35/78)	(65/78)	(66/78)	(42/81)	(63/81)	(66/81)
<b>Estadístico J de Youden</b>	0.64	0.68	0.74	-0.08	0.68	0.70	0.06	0.57	0.643
<b>LR+ (Razón de verosimilitud)</b>	9.36	4.80	29.50	0.72	13.56	14.00	1.62	12.14	-
<b>LR- (Razón de verosimilitud)</b>	0.30	0.17	0.24	1.10	0.28	0.26	0.93	0.40	0.357

Tabla 3.4. Expresión de nuevos marcadores en muestras SCC. Sensibilidad, especificidad, porcentaje de verdaderos positivos (PTP), porcentaje de verdaderos negativos (PTN), exactitud, estadístico J de Youden y valores de razón de verosimilitud positiva y negativa para la tinción de PKP1, KRT15 y DSG3 según su localización nuclear, citoplásmica o membranosa.

Sensibilidad,  $TP/(TP+FN)$ ; Especificidad,  $TN/(TN+FP)$ ; PTP,  $TP/(TP+FN)$ ; PTN,  $TN/(TN+FP)$ ; Exactitud (Accuracy),  $(TP+TN)/(TP+FP+FN+TN)$ ; estadístico J de Youden,  $Sensibilidad+Especificidad-1$ ; Razón de verosimilitud positiva (LR+),  $Sensibilidad/(1-Especificidad)$ ; Razón de verosimilitud negativa (LR-),  $(1-Sensibilidad)/Especificidad$ .

De acuerdo con estos resultados, la tinción membranosa con los nuevos marcadores utilizados PKP1, KRT15 y DSG3, fue específica para  $\geq 94$  % de las muestras de SCC, obteniendo  $\geq 94$  % de verdaderos positivos en nuestra cohorte de pacientes.

### 3.5 ANÁLISIS DE COMBINACIÓN DE MARCADORES

Con el fin de determinar la combinación de los nuevos marcadores para muestras SCC que podían proporcionar un mejor diagnóstico diferencial entre AC y SCC, se utilizaron los anticuerpos en combinación. Para las muestras de SCC, la tinción de PKP1 en membrana mostró una especificidad del 97,4 % y una sensibilidad del 76,7 %, mientras que la tinción de DSG3 en membrana mostró una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 64,3 % cuando se evaluaron ambos marcadores por separado. Sin embargo, cuando se estudiaron juntos, la tinción en membrana con estos dos marcadores logró una especificidad del 100 % (95 % CI = 90,6 % - 100,0 %) aunque la sensibilidad fue del 52,4 % (95 % CI = 37,7 % - 66,6 %).

Por otro lado, respecto del marcador TTF-1, la tinción positiva con TTF-1 proporcionó una especificidad del 97,7 % y una sensibilidad del 75 % para AC. Cuando los tres marcadores se consideraron juntos (PKP1, DSG3 y TTF-1) en el Panel 1 SCC (tinción de membrana positiva para PKP1 y DSG3 y tinción negativa para TTF-1), como se puede observar en la Tabla 3.5, la especificidad para las muestras de SCC aumentó al 100,0 % (IC del 95 % = 90,6 % - 100,0 %) aunque la sensibilidad fue del 52,4 % (IC 95 % = 37,7 % - 66,6 %).

En cuanto a la tinción con el marcador KRT15 en membrana arrojó una especificidad del 97,4 % y una sensibilidad del 75,6 % para las muestras de SCC, y, por otro lado, la tinción con Napsina A aportó una especificidad del 93,2 % y una sensibilidad del 80,5 % para las muestras de AC, cuando estos marcadores se evaluaron por separado.

Cuando los cinco marcadores se consideraron juntos en el Panel 2 SCC (tinción membranosa positiva para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción negativa para TTF-1 y

Napsina A), como se puede observar en la Tabla 3.5, la especificidad para las muestras de SCC aumentó al 100,0 % (IC del 95 % = 89,6 % - 100,0 %), aunque la sensibilidad fue del 47,5 % (IC 95 % = 32,9 % - 62,5 %).

En el caso de las muestras de AC, la evaluación combinada de tinción de membrana negativa para PKP1 y DSG3 y TTF-1 positivo, en el Panel 1 AC, como se puede observar en la Tabla 3.5, aumentó la especificidad para muestras de AC al 100,0 % (IC del 95 % = 91,6 % - 100,0 %), aunque la sensibilidad fue del 24,3 % (IC del 95 % = 13,4 % - 40,1 %).

Como se puede observar en la tabla 3.5, en el Panel 2 AC se consideraron juntas las tinciones de membrana negativas para PKP1, DSG3 y KRT15 y las tinciones positivas para TTF-1 y Napsina A, con lo que la especificidad para las muestras de AC aumentó al 100,0 % (IC del 95 % = 91,2 % - 100,0 %) y la sensibilidad fue del 63,6 % (IC 95 % = 46,6 % - 77,8 %).

#### SQUAMOUS CELL CARCINOMA

	Especificidad	Sensibilidad	AUC
Panel 1 SCC: PKP1m+/DSG3m+/TTF1-	100 %	52.4 %	0.7619
Panel 2 SCC: PKP1m+/DSG3m+/KRT15m+/TTF1-/Napsina A-	100 %	47.5 %	0.7375

#### ADENOCARCINOMA

	Especificidad	Sensibilidad	AUC
Panel 1 AC: PKP1m-/DSG3-/TTF1+	100 %	24.3 %	0.8552
Panel 2 AC: PKP1m-/DSG3m-/KRT15m- /TTF1+/Napsina A+	100 %	63.6 %	0.8088

Tabla 3.5. Combinación de anticuerpos útiles para el diagnóstico de SCC y AC

### 3.6 ANÁLISIS DE CURVAS ROC

En aquellas pruebas diagnósticas en las que los valores de la prueba son cuantitativos podemos determinar los puntos de corte de nuestra prueba, con lo cual la sensibilidad y la especificidad variarán.

En el caso de emplear variables continuas debe determinarse qué valor se utilizará para clasificar las muestras de los pacientes como AC o SCC.

La curva ROC (Receiver Operating Characteristic) nos permite relacionar la proporción de verdaderos positivos (sensibilidad) con la proporción de falsos positivos (1-especificidad), o cociente de probabilidad positivo. De esta manera, podemos determinar la exactitud diagnóstica, es decir, ver en qué punto tenemos la mayor probabilidad de clasificar correctamente la muestra al aplicar la prueba diagnóstica. Así, un valor del 60 % significa que por ejemplo una muestra de AC tiene un 60 % más de probabilidad de tener la prueba positiva para AC que una muestra SCC.

En cuanto a la interpretación de la curva ROC (Gómez González & Pérez Castán, 2007) (James et al., 2021):

- La curva ROC es creciente si se modifica el valor de corte para obtener mayor sensibilidad; esto se puede hacer a cambio de disminuir al mismo tiempo la especificidad.
- La diagonal que une los vértices inferior izquierdo y superior derecho, indica el momento en que la curva no sería discriminatoria, es decir se observan los mismos resultados en AC que en SCC.
- La exactitud de la prueba aumenta a medida que la curva se desplaza desde la diagonal hacia el vértice superior izquierdo. En el caso de tener 100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad, es decir, la discriminación fuera perfecta pasaría por dicho punto.

Se ajustaron modelos de regresión logística para evaluar la capacidad de cada marcador o combinación de marcadores para predecir la clasificación de las muestras como AC o SCC y se construyeron curvas ROC en base a las predicciones generadas por cada modelo.

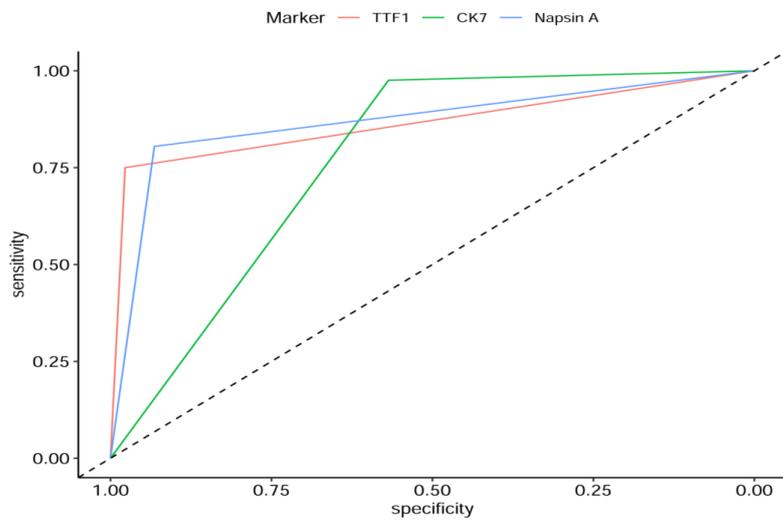


Figura 3.13. Curva ROC para los marcadores de AC.

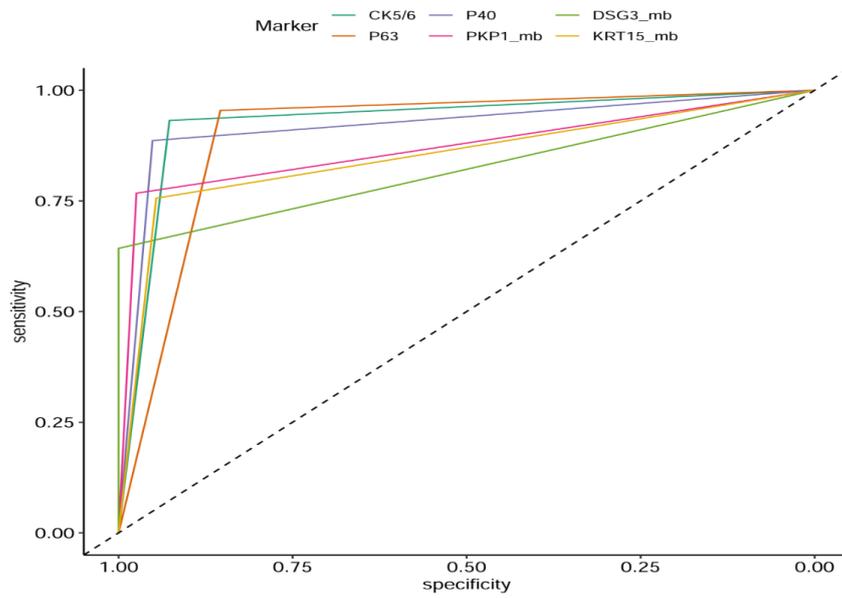


Figura 3.14. Curva ROC para los marcadores de SCC.

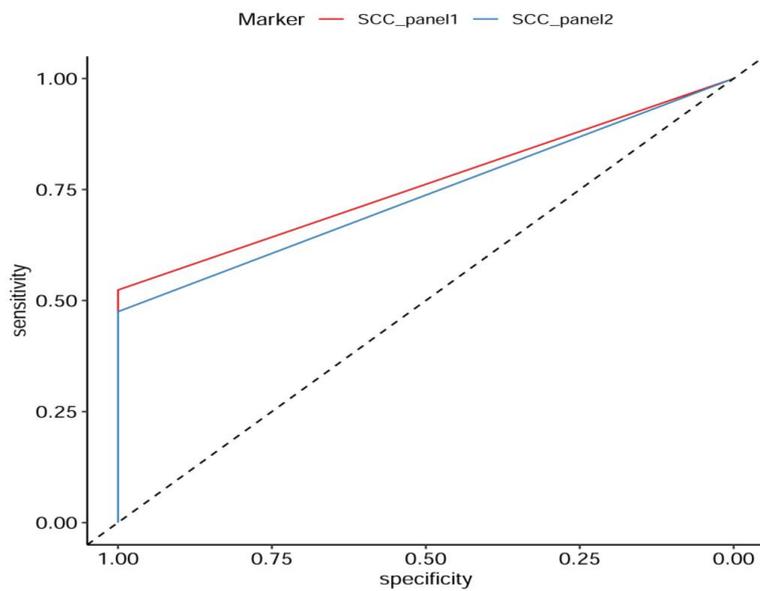


Figura 3.15. Curva ROC para los paneles de marcadores de SCC.

El área bajo la curva ROC (o AUC) representa un resumen estadístico óptimo para comparar la sensibilidad y especificidad de los nueve marcadores (CK5/6, p40, p63, CK7, TTF1, Napsina A, PKP1, KRT15 y DSG3). Para nuestra cohorte de 85 neoplasias pulmonares malignas primarias, 41AC y 44 SCC, incluidos todos los grados histológicos, p63 (0,965) mostró un AUC más alto, seguido de CK 5/6 (0,960) y p40 (0,938), con valores de AUC > 0,9, mientras que los valores de AUC para los demás marcadores estuvieron entre 0,8 y 0,9. Los valores de AUC se muestran en la Tabla 3.6.

95% asymptotic confidence interval

Marker	AUC	Asymptotic significance	Lower limit	Upper limit
PKP1_mb	0.861	0.000	0.773	0.950
DSG3_mb	0.813	0.000	0.712	0.913
KRT15_mb	0.861	0.000	0.773	0.949
TTF1	0.869	0.000	0.784	0.954
Napsina A	0.887	0.000	0.808	0.966
CK7	0.863	0.000	0.779	0.946
p63	0.965	0.000	0.923	1.000
CK5/6	0.960	0.000	0.914	1.000
p40	0.938	0.000	0.880	0.996

Tabla 3.6. Valores del área bajo la curva (AUC) para los marcadores convencionales y nuevos.

Los análisis estadísticos que evalúan la concordancia y la reproducibilidad en el análisis de marcadores convencionales se muestran en las tablas 3.2, 3.3, 3.5 y 3.6 mientras que los análisis estadísticos que evalúan la concordancia y la reproducibilidad en el análisis de marcadores nuevos se muestran en las tablas 3.4, 3.5 y 3.6.

### 3.7 MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE POR PASOS

Se construyó un modelo de regresión logística multivariable paso a paso para determinar el panel de marcadores inmunohistoquímicos óptimo para

diferenciar entre SCC y AC. El mejor resultado incluyó la combinación de los marcadores CK5/6, p63 y PKP1 en membrana, lo que dio un porcentaje de clasificación correcta del 96,2 % en general (94,6 % de AC y 97,6 % de SCC).

### **3.8 EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES SCC EN RELACIÓN CON EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN**

Dado que la tipificación histológica constituye un desafío en los carcinomas pobremente diferenciados, especialmente en muestras de biopsia pequeñas, estudiamos la relación entre la expresión de los nuevos marcadores SCC y el grado de diferenciación. Para este análisis se utilizaron 77 muestras en las cuales el grado de diferenciación pudo ser determinado. De estas muestras, había un total de 8 muestras clasificadas como bien-diferenciadas, 37 moderadamente-diferenciadas y 32 pobremente-diferenciadas.

Observamos que la tinción con los tres nuevos marcadores fue más específica para SCC, especialmente en áreas moderadamente o bien diferenciadas, detectándose principalmente en las membranas celulares. Las tinciones características de los marcadores DSG3 y PKP1 estaban especialmente relacionadas con el grado de diferenciación. En la presente investigación, agrupamos las muestras bien y moderadamente-diferenciadas y las comparamos con muestras pobremente-diferenciadas. La tinción nuclear DSG3 positiva fue más frecuente en muestras poco diferenciadas (22,6 %) que en muestras bien o moderadamente diferenciadas (6,67 %) (Prueba exacta de Fisher: razón de probabilidad = 4,01; IC del 95 % = 0,82-26,24;  $p = 0,08$ ).

La tinción de PKP1 nuclear difirió entre las muestras de SCC y AC. Entre las 30 muestras de SCC con tinción de PKP1 nuclear, el 53,3 % eran pobremente-diferenciadas y el 46,7 % eran muestras bien o moderadamente-diferenciadas. Las tres muestras de AC con tinción nuclear eran muestras bien o moderadamente-diferenciadas (diferencia no significativa), Figuras 3.8 y 3.9.

### **3.9 EXPRESIÓN DE MARCADORES EN RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

En el estudio de la expresión de los distintos marcadores en relación con las características clínicas de los pacientes hay que destacar que no se encontraron

relaciones estadísticamente significativas en muchos casos, posiblemente debido al tamaño de muestra limitado.

Se encontraron diferencias significativas para la expresión de los distintos marcadores en muestras de AC, en los siguientes casos, reflejados en la Tabla 3.7:

- Para la tinción en membrana del marcador PKP1 en relación con metástasis ( $p=0,003$ ).
- Para la tinción en núcleo del marcador DSG3 en relación con el sexo ( $p=0,014$ ) y con el consumo de tabaco ( $p=0,032$ ).
- Para la tinción en citoplasma del marcador DSG3 en relación con el estadiaje ( $p=0,038$ ).
- Para la tinción del marcador p63 en relación con el tamaño tumoral (T) ( $p=0,014$ ) y con la afectación ganglionar (N) ( $p=0,036$ ).

En el estudio de la expresión de los distintos marcadores en relación con las características clínicas de los pacientes, no se encontraron diferencias significativas para la expresión de los distintos marcadores en muestras de SCC, Tabla 3.8.

ADENOCARCINO MA	PKP1			DSG3			KRT15			CK5/6	p40	p63	CK7	TTF1	Napsina
	Núcleo	Citoplasma	Membrana	Núcleo	Citoplasma	Membrana	Núcleo	Citoplasma	Membrana						
Sexo	No (1,000)	No (0,617)	No (1,000)	<b>0,014</b>	No (0,331)	-	No (1,000)	No (0,390)	No (0,390)	No (0,488)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,656)	No (1,000)
Tabaco	No (0,638)	No (0,643)	No (1,000)	<b>0,032</b>	No (0,296)	-	No (0,251)	No (0,325)	No (0,325)	No (1,000)	No (0,631)	No (0,562)	No (1,000)	No (0,291)	No (0,445)
EPOC	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,485)	No (1,000)	-	No (0,704)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,603)	No (0,229)	<b>0,177</b>	No (1,000)	No (0,688)	No (0,691)
Diferenciación	No (0,439)	No (0,621)	No (1,000)	No (1,000)	<b>0,192</b>	-	No (0,585)	No (0,492)	No (0,492)	No (1,000)	<b>0,209</b>	No (0,379)	-	No (0,710)	No (0,711)
Localización	No (0,388)	No (0,507)	No (0,666)	No (0,277)	No (0,541)	-	No (0,770)	No (0,691)	No (0,691)	<b>0,070</b>	No (1,000)	No (0,694)	No (1,000)	No (0,561)	No (0,743)
Metástasis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estadio NSCLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	No (1,000)	No (0,349)	No (1,000)	No (0,511)	<b>0,108</b>	-	<b>0,072</b>	No (1,000)	No (1,000)	No (0,716)	No (0,556)	<b>0,014</b>	No (1,000)	No (1,000)	No (0,908)
N	No (1,000)	No (0,411)	No (1,000)	No (0,658)	No (1,000)	-	No (0,811)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,570)	No (1,000)	<b>0,036</b>	No (1,000)	<b>0,134</b>	No (0,238)
M	No (1,000)	No (0,184)	<b>0,003</b>	No (1,000)	No (1,000)	-	No (0,278)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	<b>1,000</b>	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)
Estadiaje	No (1,000)	No (1,000)	-	No (0,409)	<b>0,038</b>	-	No (0,212)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,672)	<b>0,207</b>	<b>0,070</b>	-	No (0,488)	No (0,737)

Tabla 3.7. Análisis de expresión de marcadores y características clínicas en muestras de AC.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica; T: Tamaño tumoral; N: Afectación ganglionar; M: Metástasis

EPIDERMOIDE	PKP1			DSG3			KRT15			CK5/6	p40	p63	CK7	TTF1	Napsina
	Núcleo	Citoplasma	Membrana	Núcleo	Citoplasma	Membrana	Núcleo	Citoplasma	Membrana						
Sexo	No (1,000)	No (0,386)	0,142	No (1,000)	No (0,553)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,187)	0,156	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,573)	No (1,000)	No (0,209)
Tabaco	0,121	0,154	No (1,000)	No (0,329)	No (0,296)	0,145	No (1,000)	No (0,688)	0,694	No (1,000)	No (0,615)	No (1,000)	0,07	No (1,000)	No (1,000)
EPOC	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,340)	No (0,743)	No (0,508)	No (0,236)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,486)	No (0,340)	No (0,486)	0,022	No (1,000)	No (1,000)
Diferenciación	No (0,270)	No (1,000)	No (0,757)	No (0,318)	No (1,000)	No (0,414)	No (0,253)	No (0,871)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,798)	No (1,000)	0,191	No (0,534)	No (1,000)
Localización	No (0,211)	No (0,714)	No (0,200)	No (0,544)	No (0,525)	No (0,931)	No (0,422)	No (0,387)	No (0,207)	No (0,252)	No (0,393)	0,125	No (0,787)	No (0,437)	No (0,335)
Metástasis	-	-	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	-	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	-	-	No	-	No (1,000)
Estadio NSCLC	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	-	-	-	No (0,785)	-	-
T	No (0,668)	No (0,742)	No (0,888)	No (0,511)	No (0,898)	No (0,603)	No (0,501)	No (0,343)	0,279	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,904)	No (1,000)	No (1,000)
N	No (0,289)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,367)	No (0,250)	No (0,250)	No (0,720)	No (0,738)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	No (0,295)	No (1,000)	No (1,000)
M	No (1,000)	No (1,000)	No (1,000)	-	-	-	No (1,000)								
Estadaje	No (0,548)	No (0,854)	No (0,340)	No (0,480)	No (0,961)	No (0,827)	No (0,357)	No (0,625)	No (0,691)	No (1,000)	No (0,454)	No (1,000)	0,155	No (1,000)	No (1,000)

Tabla 3.8. Análisis de expresión de marcadores y características clínicas en muestras de SCC.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica; T: Tamaño tumoral; N: Afectación ganglionar; M: Metástasis

### 3.10 EXPRESIÓN DE NUEVOS MARCADORES SCC EN RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA

En el estudio de la expresión de los nuevos marcadores en muestras de SCC en relación con la supervivencia se contó con los datos correspondientes para 78 pacientes, 38 pacientes SCC y 40 AC. En la Figura 3.16 se muestra la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para el marcador PKP1, en este análisis se observó una relación entre la tinción positiva de PKP1 y una tendencia a una supervivencia más prolongada, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (log-rank  $p = 0,19$ ), posiblemente debido al tamaño limitado de nuestra muestra. Así mismo, se observó también una tendencia no significativa para una supervivencia más prolongada en los pacientes con SCC versus AC (log-rank  $p = 0,47$ ).

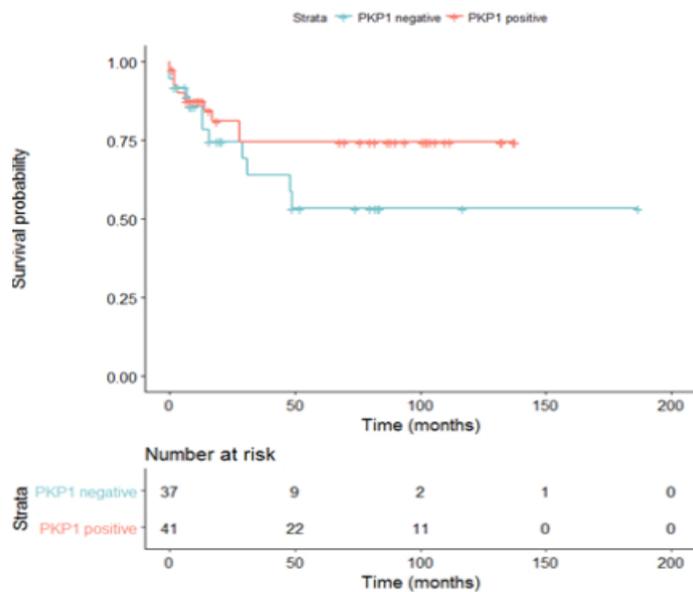


Figura 3.16. Análisis de supervivencia de nuestra cohorte de 38 pacientes SCC y 40 AC, clasificados como "PKP1 negativo" o "PKP1 positivo" según la tinción inmunohistoquímica de PKP1.

Con el fin de superar esta limitación en el tamaño de la muestra y eliminar el subtipo de tumor como factor de confusión, estudiamos también a 495 pacientes en la cohorte de pacientes de la base de datos TCGA-LUSC (The Cancer Genome Atlas) para quienes se disponía de datos de supervivencia y expresión génica, estos datos se reflejan en la Tabla 3.9. En esta cohorte se encontró una relación de correlación significativa entre una mayor expresión de PKP1 y una mejor supervivencia global que se muestra en la Figura 3.17, obteniendo un cociente de riesgos instantáneos de 0,951 (IC 95 % = 0,907-0,997;  $p = 0,036$ ) en un modelo de riesgos proporcionales de Cox después de ajustar para variables de confusión.

	N
<b>Sex</b>	
Male	366
Female	129
<b>Age (years, mean <math>\pm</math> SD)</b>	67.23 $\pm$ 8.56
<b>Tumor stage</b>	
I	242
II	159
III/IV	90
<b>Vital status</b>	
Alive	283
Deceased	212
<b>Total</b>	495

Tabla 3.9. Cohorte de pacientes analizados en la base de datos TCGA-LUSC (The Cancer Genome Atlas).

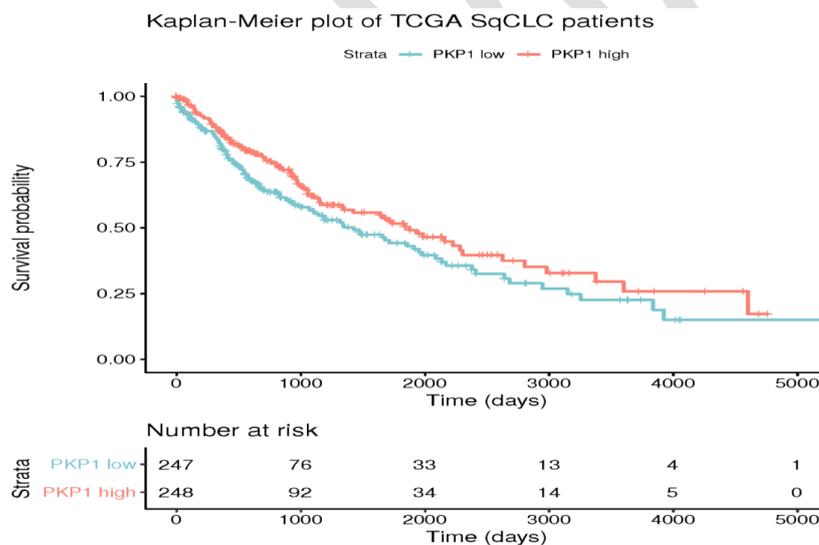


Figura 3.17. Análisis de supervivencia de la cohorte de pacientes de la base de datos TCGA-LUSC (N = 495 pacientes con SCC), clasificados según el nivel de ARN de PKP1 medido por RNA-Seq y clasificados como "PKP1 bajo" (por debajo del valor medio) o "PKP1 alto" (por encima del valor medio).

Por otro lado, se llevaron a cabo también análisis de supervivencia en la cohorte TCGA para todos los biomarcadores de SCC, tanto los convencionales como los

nuevos propuestos en este trabajo, en las mismas condiciones que el análisis de PKP1. Para los análisis univariados, estratificamos a los pacientes como "altos" o "bajos" para cada marcador en función de que la expresión de dicho marcador estuviera por encima o por debajo del valor medio, y se trazaron las curvas de Kaplan-Meier correspondientes. Estos resultados se reflejan en las Figuras 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22.

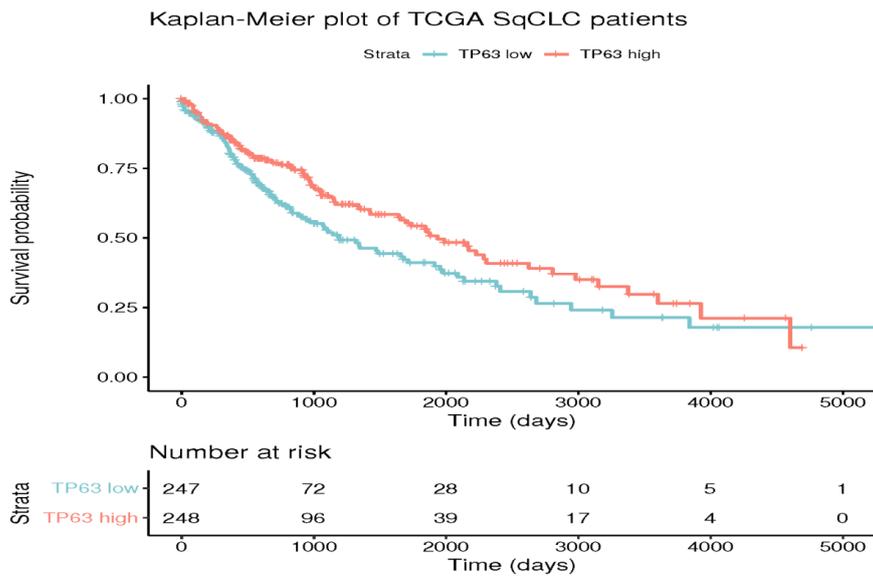


Figura 3.18. Curva Kaplan-Meier del marcador p63 en la cohorte de TCGA para pacientes SCC.

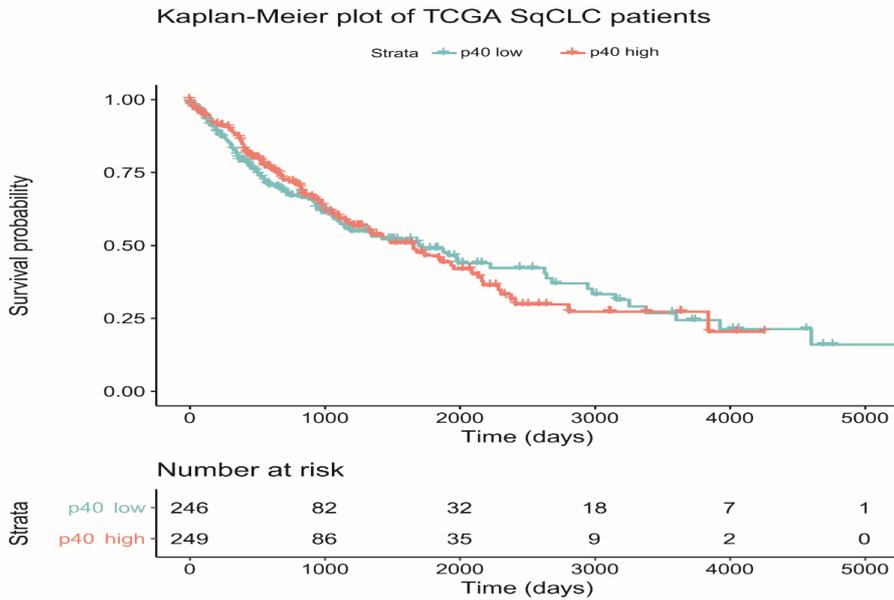


Figura 3.19. Curva Kaplan-Meier del marcador p40 de la cohorte de TCGA para pacientes SCC.

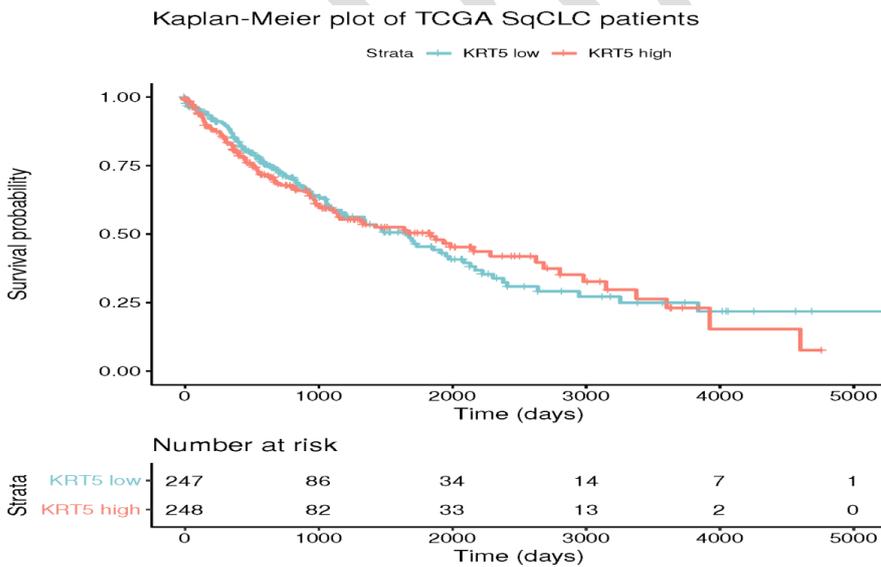


Figura 3.20. Curva Kaplan-Meier del marcador KRT5/6 de la cohorte de TCGA para pacientes SCC.

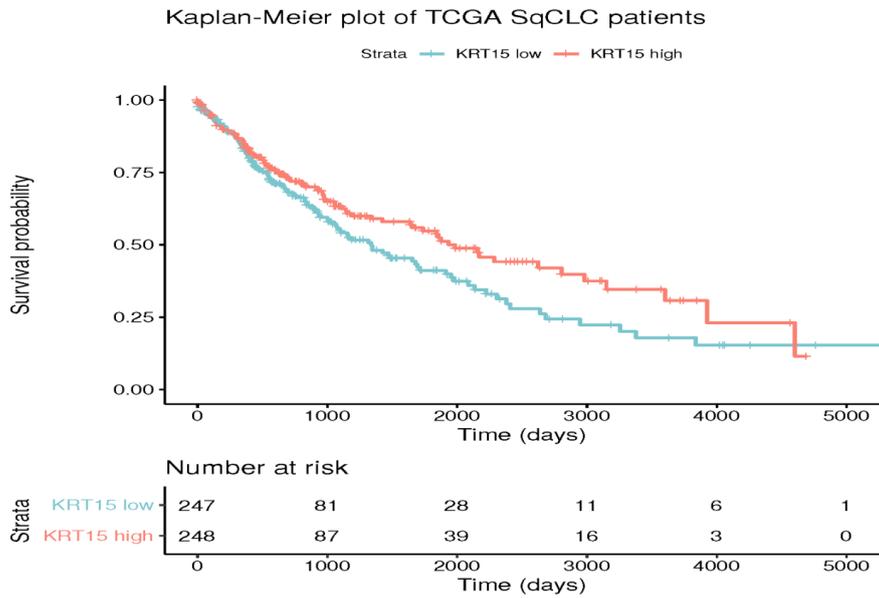


Figura 3.21. Curva Kaplan-Meier del marcador KRT15 de la cohorte de TCGA para pacientes SCC.

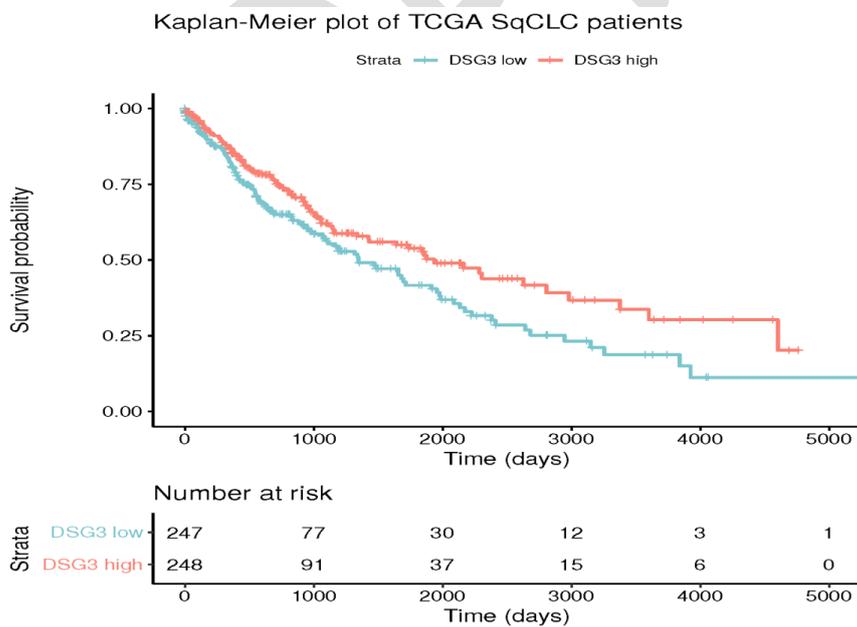


Figura 3.22. Curva Kaplan-Meier del marcador DSG3 de la cohorte de TCGA para pacientes SCC.

En los análisis multivariados, aplicamos modelos de riesgos proporcionales de Cox para cada marcador, teniendo en cuenta la edad, el sexo y el estadio del tumor del paciente, con el fin de evaluar la relación de la expresión a nivel de ARNm con la supervivencia del paciente como se refleja en las Figuras 3.23 a 3.28.

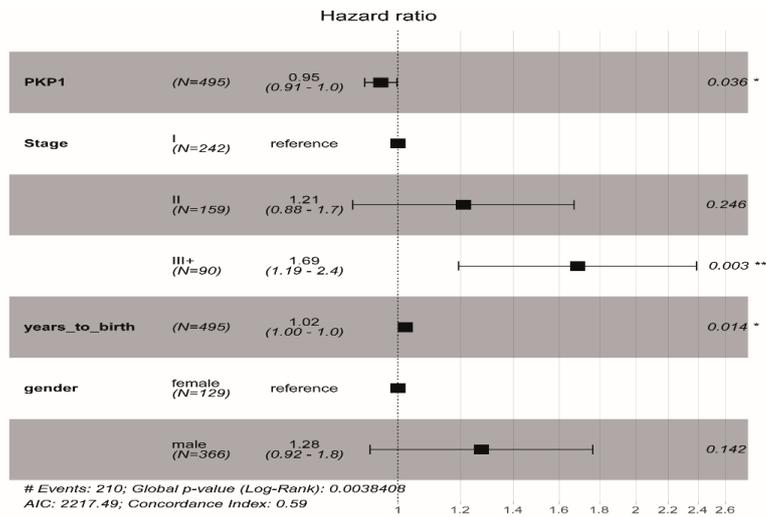


Figura 3.23. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador PKP1.

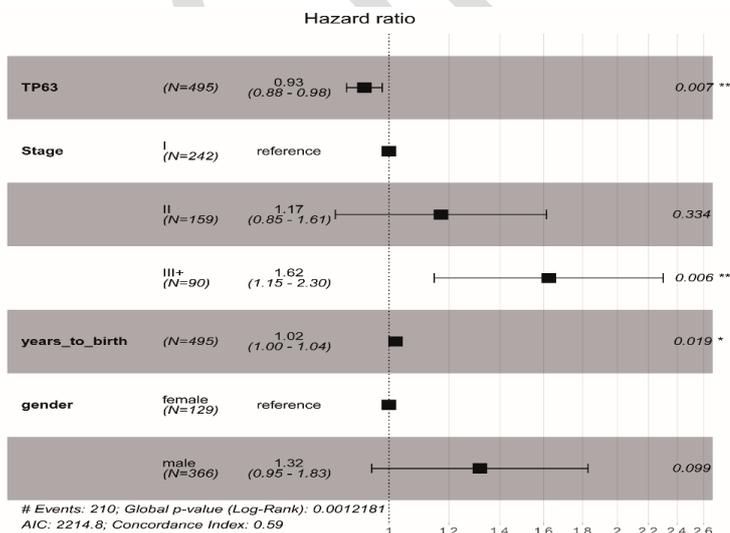


Figura 3.24. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador p63.

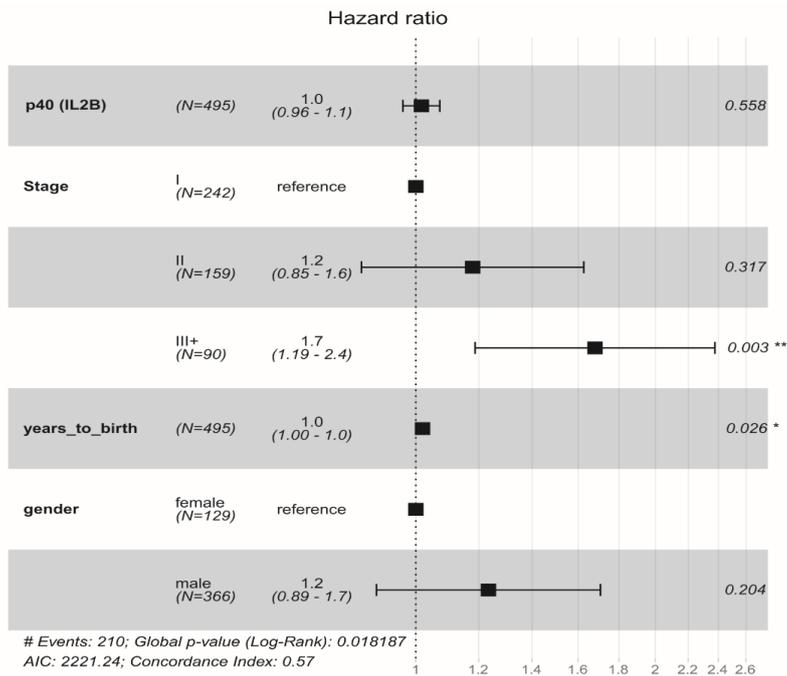


Figura 3.25. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador p40.

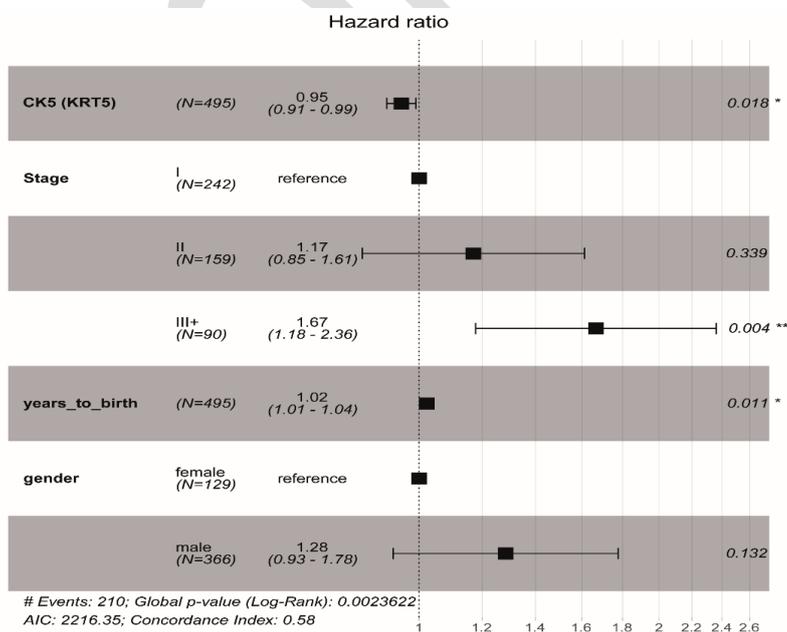


Figura 3.26. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador KRT5/6.

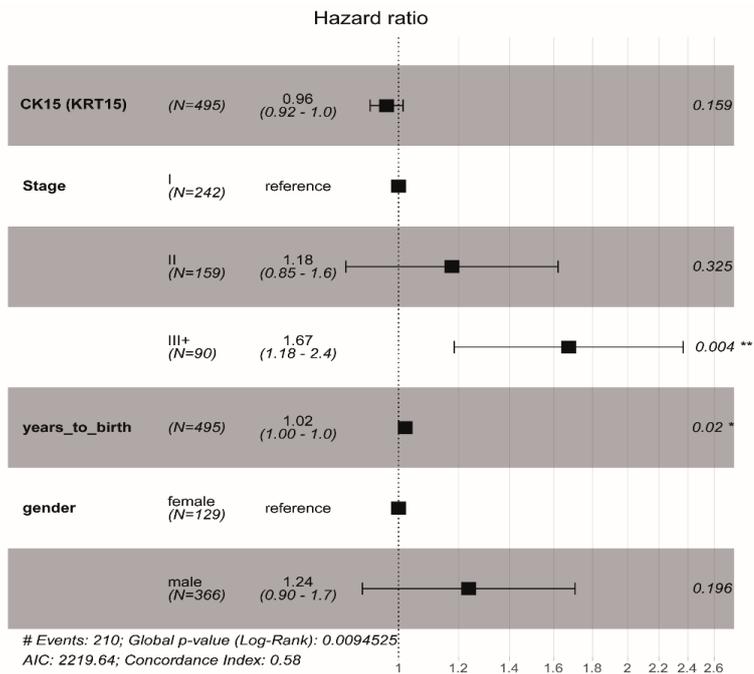


Figura 3.27. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador KRT15.

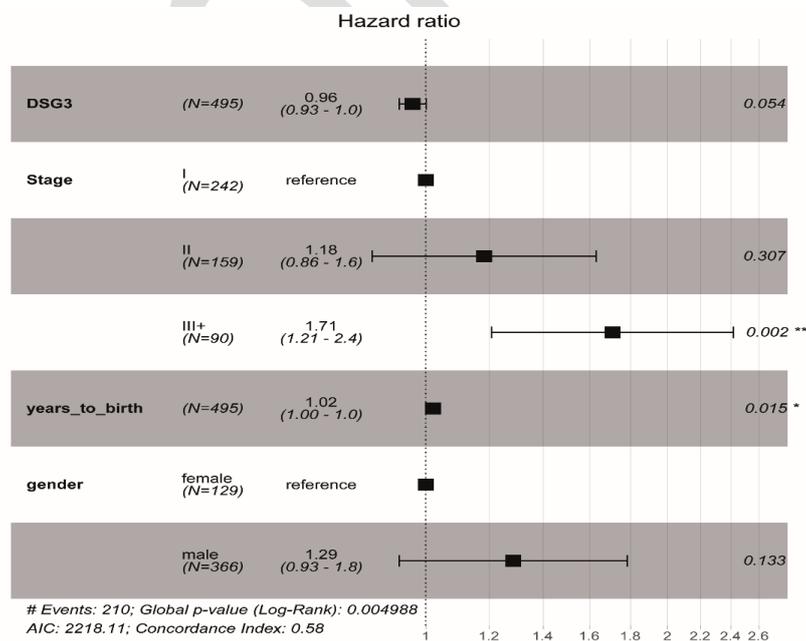


Figura 3.28. Modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales para el marcador DSG3.

En los análisis multivariados, la alta expresión de tres marcadores SCC se asoció con una mejor supervivencia: p63 ( $p=0,007$ , HR=0,93 [0,88-0,98]), PKP1 ( $p=0,036$ , HR= 0,95 [0,91-1,0] como se ha indicado previamente), y CK5 ( $p=0,018$ , HR=0,95 [0,91-0,99]). Por otro lado, la asociación del marcador DSG3 con la supervivencia fue cercana a la significación estadística ( $p=0,054$ , HR=0,96 [0,93-1,0]). A nivel de ARNm, en el caso de la expresión de los marcadores KRT15 o p40 no se asoció con una mayor supervivencia del paciente.

COPIA

## 4. DISCUSIÓN

---

COPIA

En los países desarrollados y en algunos en vías de desarrollo, las enfermedades vasculares ocupan el primer lugar de causa de muerte en la población. Sin embargo, el cáncer de pulmón sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer tanto entre hombres como mujeres a nivel mundial y se prevé un incremento en la tendencia hasta el 2030. El cáncer de pulmón es el cuarto tumor más diagnosticado en mujeres, después del cáncer de mama, colorrectal y cuerpo del útero, y entre los hombres, es el que tiene más incidencia seguido del cáncer de próstata y el de estómago (Stewart et al., 2014).

Para la clasificación de los tumores de pulmón (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021) es una clasificación histológica y, por tanto, basada principalmente en características morfológicas. Los tumores malignos epiteliales se han dividido clásicamente y de forma genérica, en dos grupos: carcinoma de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC), incluyendo este último tres subtipos principales: adenocarcinoma (AC), carcinoma escamoso (SCC) y carcinoma de células grandes (Beasley et al., 2005). La mayoría de los NSCLC se pueden clasificar fácilmente como AC o SCC en biopsias sin usar tinciones especiales adicionales o inmunohistoquímica (Terry et al., 2010a) (Terry et al., 2010a) (Loo et al., 2010) (Ring et al., 2009). Como un porcentaje alto de enfermos se diagnostican en fase avanzada de la enfermedad y no van a ser candidatos a cirugía, el diagnóstico se realiza en muchos casos sobre muestras pequeñas y no sobre piezas quirúrgicas. La necesidad de preservar al máximo este material para estudios moleculares/genéticos, que permita elegir una terapia precisa para cada enfermo, hace que se recomiende el uso de técnicas histoquímicas para mucinas e inmunohistoquímicas solo para casos en que no se pueda alcanzar el diagnóstico con el examen histológico con técnicas convencionales (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2021). Sin embargo, una clasificación precisa puede ser difícil en casos de carcinoma de pulmón poco diferenciado o incluso puede ser muy complicado cuando el material que se dispone para el análisis presenta artefactos.

Hay que tener en cuenta que una proporción muy alta, que puede llegar hasta el 70 % de los tumores pulmonares, son irreseccables en el momento del diagnóstico (Travis, Brambilla, Burke, et al., 2015), en estos casos, la muestra de biopsia suele ser el único material disponible para una correcta subtipificación de la neoplasia y para estudios moleculares que ayuden a seleccionar una terapia correcta. En el caso de los tumores de pulmón, la relevancia de una precisión diagnóstica en estas muestras subóptimas ha conducido a que la OMS, en sus últimas revisiones de los tumores pulmonares, dedique un apartado, en el caso de la clasificación del 2015, y un capítulo entero, en el caso de la del 2021, al diagnóstico de muestras pequeñas (Organisation mondiale de la santé & Centre

international de recherche sur le cancer, 2021). Nuestro estudio se centró en biopsias incisionales pequeñas ( $\leq 0,4\text{cm}$ ) tomadas durante la cirugía con tamaño por tanto parecido a las muestras pequeñas obtenidas por endoscopia. Como se ha comentado previamente, la subtipificación precisa en muestras de NSCLC es esencial para seleccionar el enfoque terapéutico apropiado (Travis et al., 2013). Los marcadores más aceptados para identificar diferenciación hacia AC son TTF1 y Napsina A. Generalmente se prefiere el primero porque, al ser un marcador nuclear, su positividad es más fácil de valorar (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2015). En relación con la diferenciación escamosa se considera a p40 como el marcador más específico y sensible (Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer, 2015). En muchos laboratorios histopatológicos, las biopsias pequeñas se subtipifican rutinariamente mediante la combinación de un marcador de AC (TTF-1) y un marcador de SCC (p63 o p40) (Travis et al., 2013) (Bishop et al., 2012) (Pelosi et al., 2012), sin embargo, existen numerosas dificultades en el diagnóstico diferencial entre SCC y AC por inmunohistoquímica. Por ejemplo, los clones de anticuerpos monoclonales frente a TTF1 más utilizados son 8G7G3/1 y SPT24, sin embargo, se ha determinado que dichos anticuerpos tienen diferentes sensibilidades y especificidades, siendo 8G7G3/1 más específico y SPT24 más sensible (Matoso et al., 2010). Entre los marcadores para SCC, el marcador p40 se considera el más específico pero, puede ser positivo en el 3 % de los AC (Inamura, 2018).

En el presente trabajo se pone de manifiesto que, en relación con la expresión de los marcadores convencionales, entre los marcadores CK7, TTF1 y Napsina A, característicos de AC, y CK 5/6, p40 y p63, característicos de SCC, solo TTF1 en AC y p40 en SCC fueron específicos en  $\geq 94$  % de las muestras utilizadas en el estudio con  $\geq 94$  % de verdaderos positivos. Nuestros resultados, por tanto, también apoyan el valor de TTF1 y p 40 como marcadores de diferenciación de AC y SCC respectivamente.

Los estudios en secciones de tejido completo indican que las muestras de SCC tienen un inmunofenotipo relativamente preciso, es decir, negatividad para TTF-1 y positividad para p63, CK5/6 y 347E12. Por el contrario, las muestras de AC son mucho más heterogéneas y solo se considera característica la positividad difusa para TTF-1 dado que una apreciable proporción de las muestras de AC también expresan marcadores considerados típicos de los tumores SCC, incluyendo los marcadores p63 (32 %), CK5/6 (18 %) y 347E12 (82 %). Por lo tanto, aunque útiles, ningún marcador para muestras de tumores SCC es completamente específico (Rekhtman et al., 2011).

En este estudio, seleccionamos tres marcadores nuevos: PKP1, KRT15 y DSG3 que previamente habían sido descritos por nuestro grupo como biomarcadores

en cáncer de pulmón (Sanchez-Palencia et al., 2011) (Gómez-Morales et al., 2013). El objetivo de nuestro trabajo fue llevar a cabo una evaluación detallada y comparar los tres nuevos marcadores con los seis marcadores convencionales que están bien descritos en la literatura y que en muchos laboratorios de histopatología utilizan de forma rutinaria (Mukhopadhyay & Katzenstein, 2011) (Terry et al., 2010) (Tacha D, Zhou D, Henshall-Powell RL, 2010) (Tacha D, Yu CH, Haas T, 2011). Se utilizó como referencia para nuestra evaluación, “gold standard”, el diagnóstico de la pieza quirúrgica completa.

Nuestro estudio requirió especímenes de resección además de biopsias incisionales pequeñas tomadas durante la cirugía, este requisito fue esencial para validar los resultados, pero limitó el número de muestras de la serie.

Los nuevos marcadores propuestos en este trabajo (PKP1, DSG3 y KRT15) para el diagnóstico diferencial de muestras de cáncer de pulmón pertenecientes a las variantes histológicas AC y SCC son componentes de las uniones celulares entre células y localizados en la placa del desmosoma. Los desmosomas son puntos de contacto intercelular en forma de botón que permiten la unión de elementos del citoesqueleto a la membrana plasmática en las zonas de contacto de célula-célula. Al anclarse a los filamentos intermedios que soportan estrés, los desmosomas proporcionan una fuerte adhesión intercelular para mantener la integridad tisular y la homeostasis. Los desmosomas están compuestos por proteínas de al menos tres familias de genes distintas: cadherinas (por ejemplo, DSG1-4 y DSC1-3), proteínas de armadillo (p. ej., placoglobina y varias placofilinas), y plaquinas (por ejemplo, desmoplaquinas, envoplaquinas y periplaquinas). Estas proteínas desmosomales están coordinadas y asociadas unas con otras para formar el desmosoma. Este andamiaje supracelular resultante juega un papel clave para proporcionar integridad mecánica a los tejidos (D. R. Garrod et al., 2002) (Green & Gaudry, 2000) (T. Yin & Green, 2004). [1–3]. Además de su papel en la adhesión célula-célula, las proteínas de cadherina y armadillo pueden funcionar como transductores para convertir un evento extracelular en señales intracelulares (G. Zhou et al., 2017).

Tanto para PKP1, como para los marcadores DSG3 y KRT15 nuestro grupo había estudiado previamente su localización nuclear, citoplasmática y membranosa en muestras de cáncer de pulmón y había determinado que pueden ser utilizados en el diagnóstico de pacientes con SCC (Gómez-Morales et al., 2013). Es por todo ello, que se decidió valorar en este estudio para estos nuevos marcadores, la tinción inmunohistoquímica tanto en núcleo como citoplasma y membrana para incorporar esas diferencias el diagnóstico diferencial entre AC y SCC.

PKP1 se encuentra ubicuamente localizado en citoplasma y núcleo en numerosos tipos celulares además de su localización en membrana (Bonne et al., 1999)

(Fischer-Kešo et al., 2014) (Hofmann et al., 2006) donde interviene en redes de señalización entre los distintos compartimentos celulares. PKP1 se expresa más ampliamente en las capas suprabasales de epitelios estratificados y complejos (Hatzfeld, 2007) (Kapprell et al., 1988) (Bass-Zubek et al., 2009), además PKP1 actúa como modulador de la traducción de ARNm y en regulación génica post-transcripcional (Bonne et al., 1999) (Wolf et al., 2010) (Wolf & Hatzfeld, 2010) (Martin-Padron et al., 2020) (Boyero et al., 2022). Esta proteína ha sido propuesta así mismo, como biomarcador para diagnóstico y como potencial diana terapéutica en SCC (Sanchez-Palencia et al., 2011) (Gómez-Morales et al., 2013) (Martin-Padron et al., 2020) (Galindo et al., 2020) (Boyero et al., 2022). En la actualidad se sabe que la localización subcelular de PKP1 es dependiente de su estado de fosforilación y esto es el principal mecanismo regulador de su función. Así por un lado, la forma no fosforilada de PKP1 interacciona con desmoplaquina en los desmosomas y promueve adhesión celular en ausencia de factores de crecimiento, ejerciendo un papel como supresor tumoral, y por otro lado, la forma fosforilada de PKP1, como resultado de la estimulación por factores de crecimiento, se localizará en el citoplasma y ejercerá un papel oncogénico mediante la inducción de la síntesis proteica y la proliferación celular (aunque en este estado fosforilada puede unirse a los desmosomas presenta menos estabilidad). Así, una pérdida de la expresión de PKP1 puede contribuir a una disminución de la adhesión celular e inducir fenotipos metastásicos en contextos en los que la ruta de señalización PI3K/AKT no está activada, siendo este escenario similar a la regulación por  $\beta$ -catenina (Wolf et al., 2013).

En relación con DSG3, se ha descrito que el extremo carboxilo terminal de DSG3 se mantiene unido a placoglobina (D. R. Garrod et al., 2002) (Green & Gaudry, 2000) (T. Yin & Green, 2004). La placoglobina está estrechamente relacionada con la  $\beta$ -catenina, que es una molécula efectora bien conocida en la vía canónica de señalización Wnt (Chidgey & Dawson, 2007). DSG3 es capaz de transducir mensajes a moléculas de señalización nuclear a través de la vía de señalización placoglobina para regular fenotipos malignos (Y.-J. Chen et al., 2013).

Respecto del marcador KRT15, se ha descrito su sobreexpresión en varios tipos de cáncer, incluido el carcinoma de esófago (Lin et al., 2020), el carcinoma de células uroteliales (Tai et al., 2013) y el cáncer gástrico (C. Zhang et al., 2019). Además, una elevada expresión de KRT15 se ha correlacionado con tamaño tumoral (T), metástasis en ganglio linfático, y mal pronóstico [5]. Además, también se ha descrito que KRT15 activa la vía de señalización de  $\beta$ -catenina/MMP-7 y, por lo tanto, promueve la migración e invasión de celular en cáncer colorrectal (W. Chen & Miao, 2022).

En el caso de los nuevos marcadores PKP1, KRT15 y DSG3, la tinción de membrana fue específica para  $\geq 94$  % de las muestras de SCC, con  $\geq 94$  % de

verdaderos positivos en las muestras utilizadas en el estudio. En cuanto al panel de anticuerpos estudiado, la clasificación tanto de las muestras de AC como las de SCC fue más eficaz cuando los anticuerpos se aplicaron sucesivamente de forma escalonada. Así, encontramos que la especificidad era mayor, 100 %, cuando los anticuerpos se usaban en combinación en lugar de individualmente. Para SCC, los paneles más efectivos fueron:

Para SCC: Panel 1 (tinción positiva de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción negativa para TTF1; AUC de 0,7619); y Panel 2 SCC (tinción positiva de membrana para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción negativa para TTF1 y Napsina A; AUC de 0,7375).

Para AC: Panel 1 (tinción negativa de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción positiva para TTF1; AUC de 0,8552); y Panel 2 AC (tinción negativa de membrana para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción positiva para TTF1 y Napsina A; AUC de 0,8088).

Los nuevos marcadores utilizados en nuestro estudio mostraron una tinción heterogénea en las muestras SCC, que se observó en las membranas y el citoplasma de las células más diferenciadas, marcando las uniones intercelulares, detectándose con mayor frecuencia la tinción de los núcleos en áreas de apariencia más inmadura. En las muestras de AC, se detectó tinción focal con estos nuevos marcadores en el núcleo y el citoplasma, pero nunca en la membrana.

Como se ha comentado anteriormente, además de su papel en la adhesión celular, se ha publicado en los últimos años que las placofilinas, incluida PKP1, se localizan en el citoplasma y el núcleo, donde se cree que pueden ejercer diversas funciones no dilucidadas por completo en la actualidad (Sobolik-Delmaire et al., 2010). Esto explica la positividad nuclear y citoplasmática observada, principalmente en las muestras SCC de nuestra serie. En algunos casos y en algunas células, también hemos visto tinción nuclear ocasional para CKT15 y DSG3. No se ha recogido hasta el momento la existencia de una localización nuclear de CKT15 y DSG3 (Brown & Wan, 2015) (Bose et al., 2013), por otro lado, tampoco se puede descartar una tinción inespecífica, pero sin embargo, hay que tener en cuenta que se ha demostrado que varias proteínas del citoesqueleto, que anteriormente se pensaba que eran exclusivamente citoplasmáticas, e incluyen algunas queratinas (queratinas 7, 8, 17, 18), son componentes de la matriz nuclear, donde pueden tener múltiples funciones. Así, algunos estudios de piel y tumores cervicales han indicado que la queratina 17 tiene un papel en el ciclo celular y en la regulación de la expresión génica (Hobbs et al., 2016). Estos datos y el hecho de que KRT15 y DSG3 no se utilizan de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios impulsaron nuestra evaluación de la tinción nuclear.

En este sentido se justifica una mayor investigación para explorar la importancia de nuestros hallazgos.

En relación con el grado de diferenciación, para muestras SCC, la tinción de DSG3 y PKP1 fue más extensa e intensa en muestras tumorales bien o moderadamente diferenciadas versus pobremente diferenciadas, especialmente en membranas. La tinción con DSG3 nuclear fue más frecuente en muestras pobremente diferenciadas que en muestras bien o moderadamente diferenciadas. En el caso de las muestras de AC, todas aquellas con tinción en el núcleo fueron bien o moderadamente diferenciadas, aunque no se alcanzó la significación estadística.

Las muestras estudiadas en el presente estudio corresponden a pacientes estudiados en la consulta de Neumología y cirugía torácica del Área sanitaria de Andalucía Oriental, todos los pacientes fueron intervenidos en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. En el estudio de la expresión de los distintos marcadores en relación con las características clínicas de los pacientes hay que destacar que no se encontraron relaciones estadísticamente significativas en muchos casos, posiblemente debido al tamaño de muestra limitado, esto es una dificultad frecuente en los estudios clínicos, sin embargo la muestra estudiada en nuestro caso es una lo suficientemente grande y balanceada de 41 pacientes de AC y 44 pacientes de carcinoma escamoso, lo que nos permite hacer un análisis riguroso para el diagnóstico diferencial entre estos dos tipos histológicos. Una buena recogida de datos es fundamental para alcanzar los objetivos propuestos. La Historia Clínica ha sido la fuente principal de datos para nuestro estudio. La Historia Clínica es una fuente de datos rápida, sencilla y económica, aunque tiene sus limitaciones, dado que los datos han sido recogidos por personas diferentes que pueden utilizar definiciones, meticulosidad y métodos diferentes en el reflejo de los datos, es por ello que es frecuente encontrar ausencia de datos en algunos casos. En el caso de las comparaciones realizadas para los distintos marcadores en relación con las características clínicas no se encontraron diferencias significativas en muestras SCC. En el caso de las muestras AC si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso del marcador PKP1 respecto de su tinción en membrana y en relación con metástasis ( $p=0,003$ ). Para el marcador DSG3, se encontraron diferencias significativas respecto del estadiaje ( $p=0,038$ ), con el sexo ( $p=0,014$ ) y consumo de tabaco ( $p=0,032$ ). Para el caso del marcador p63 se obtuvieron diferencias significativas en relación con el tamaño tumoral (T) ( $p=0,014$ ), y afectación ganglionar (N) ( $p=0,036$ ). Estos datos deben ser contrastados en muestras más numerosas, ya que se ha descrito la relación para distintos marcadores DSG3, KRT15, PKP1 con factores pronósticos (Brown & Wan, 2015) (Bose et al., 2013).

En nuestra cohorte de pacientes, la relación de la tinción de PKP1 con una mejor supervivencia de los pacientes con SCC y AC no alcanzó significación estadística

posiblemente debido al tamaño limitado de nuestra muestra. Esta posible limitación fue superada gracias al estudio de 495 pacientes en la cohorte de pacientes de la base de datos TCGA-LUSC (The Cancer Genome Atlas) para quienes se disponía de datos de supervivencia y expresión génica, de esta manera, pudimos confirmar la existencia de una relación entre la alta expresión de ARNm de PKP1 y una mejor supervivencia general en este análisis adicional de 495 pacientes con SCC de TCGA. Además, nuestro análisis TCGA reveló una asociación casi significativa entre la alta expresión de ARNm de DSG3 y una mejor supervivencia general. Estos datos concuerdan con informes previos que asociaron la tinción positiva de DSG3 con una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de todos los subtipos histológicos (Tacha D, Yu CH, Haas T, 2011).

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican una relación entre niveles altos de ARN y proteína de PKP1 (y, en menor medida, DSG3) con una supervivencia general más prolongada. Por lo tanto, PKP1 y los niveles de expresión de DSG3 no solo sirven como marcadores específicos para SCC, sino que también pueden tener un valor pronóstico potencial.

La progresión de un tumor se asocia con frecuencia con la pérdida de la adhesión célula a célula. Se ha visto que la reducción de los componentes desmosómicos está asociada con el desarrollo tumoral. Así, la disminución en la expresión de DSG1, DSG2, DSC3, DSG3, placoglobina, PKP1-3 y desmoplaquina está asociada a mal pronóstico en pacientes con tumores de distinto tipo (tumores de cabeza y cuello, colon, piel, esófago, pulmón, cervix uterino y gástrico). De forma aparentemente paradójica, se ha visto sin embargo una regulación al alza de varios componentes desmosómicos incluyendo DSG2, DSG3, PKP3 y PKP1 en el desarrollo de varios cánceres (piel, pulmón, cabeza y cuello, próstata, colon, cervix uterino, mama y esófago) asociada a proliferación acelerada, metástasis y mal pronóstico. Todo lo anterior indica que los genes que codifican a las proteínas desmosómicas, como se ha comentado con anterioridad, tienen un papel dual como supresores tumorales y como oncogenes. La localización subcelular de las proteínas desmosómicas, las proteínas con las que interactúan, así como sus modificaciones postranslacionales probablemente dependan de factores del micromedioambiente tumoral que condicionan su función (Brown & Wan, 2015) (Y.-Q. Liu et al., 2021).

En nuestro estudio, la evaluación de CK15 y especialmente de DSG3 y PKP1 mejora el diagnóstico diferencial de SCC y AC. Sin embargo, una limitación potencial de estos marcadores SCC es que la positividad específica de la membrana se encuentra en muestras mejor diferenciadas que son más fácilmente identificables bajo el microscopio. No obstante, pueden ser especialmente útiles en muestras afectadas por un artefacto importante, ya que

ofrecen un parámetro más objetivo para evaluar el grado de diferenciación. Una ventaja adicional de estos marcadores es la ausencia total de tinción en muestras de AC pobremente diferenciados, observándose positividad citoplasmática y nuclear solo en muestras de AC moderadamente o bien diferenciadas. Estos anticuerpos podrían eventualmente ser utilizados en un cóctel, con el consiguiente ahorro de cortes histológicos. Este es un aspecto muy importante, dada la necesidad de análisis genéticos e inmunohistoquímicos en tejido de pequeñas biopsias en pacientes con carcinoma de pulmón.

A pesar del pequeño número de muestras analizadas, el modelo de regresión logística multivariante paso a paso encontró que la combinación de los marcadores CK5/6, p63 y PKP1 en la membrana dio un porcentaje de clasificación correcta del 96,2 % en general (94,6 % de AC y 97,6 % de SCC), siendo el mejor panel de marcadores inmunohistoquímicos para distinguir entre muestras de SCC y de AC.

COPY

## 5. CONCLUSIONES

---

COPIA

1. De los marcadores convencionales utilizados para detectar diferenciación hacia AC (CK7, Napsina A y TTF1) TTF1 fue el más útil con más del 94% de verdaderos positivos.
2. Entre los marcadores convencionales para SCC (CK5-6, p63 y p40) solo p40 fue específico en un número de muestras superior al 94 % con más del 94 % de verdaderos positivos.
3. La evaluación de CK15 y especialmente de DSG3 y PKP1 mejora el diagnóstico diferencial entre SCC y AC.
4. La tinción de membrana de los tres nuevos marcadores, PKP1, KRT15 y DSG3, es específica de SCC, especialmente de las áreas moderadamente o bien diferenciadas.
5. El hecho de que la positividad para CK15, DSG3 y PKP1 esté relacionada con las áreas mejor diferenciadas, aconseja su uso en conjunción con otros marcadores.
6. El modelo de regresión logística multivariante paso a paso determinó que la combinación de los marcadores CK5/6, p63 y PKP1 en la membrana dio un porcentaje de clasificación correcta del 94,6 % en muestras de AC y de 97,6 % en muestras de SCC, siendo el mejor panel de marcadores inmunohistoquímicos para distinguir entre muestras de SCC y de AC.
7. Se proponen dos paneles para el diagnóstico de SCC que proporcionan una especificidad del 100 %: Panel 1- tinción positiva de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción negativa para TTF1; con un área bajo la curva (AUC) de 0,7619. Y Panel 2- tinción positiva de membrana para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción negativa para TTF1 y Napsina A; con un área bajo la curva (AUC) de 0,7375.
8. Se proponen dos paneles para el diagnóstico de AC que proporcionan una especificidad del 100 %: Panel 1- tinción negativa de membrana para PKP1 y DSG3 y tinción positiva para TTF1; con un área bajo la curva (AUC) de 0,8552. Y Panel 2- tinción negativa de membrana para PKP1, DSG3 y KRT15 y tinción positiva para TTF1 y Napsina A; con un área bajo la curva (AUC) de 0,8088.
9. Se establece la existencia de una relación entre niveles altos de ARN y proteína de PKP1 (y, en menor medida, DSG3) con una supervivencia general más prolongada para la cohorte de pacientes de la base de datos TCGA-LUSC (The Cancer Genome Atlas). Este hecho indica que PKP1 y DSG3 son marcadores pronósticos de cáncer de pulmón de tipo escamoso.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

COPIA

- Abdalla, E. M., & Has, C. (2014). A Plakophilin-1 Gene Mutation in an Egyptian Family with Ectodermal Dysplasia-Skin Fragility Syndrome. *Molecular Syndromology*, 5(6), 304-306. <https://doi.org/10.1159/000369267>
- Abramowicz, M. J., Vassart, G., & Christophe, D. (1992). Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *European Journal of Biochemistry*, 203(3), 467-473. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16571.x>
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e1S-e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>
- Amini, A., Yeh, N., Gaspar, L. E., Kavanagh, B., & Karam, S. D. (2014). Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) for lung cancer patients previously treated with conventional radiotherapy: A review. *Radiation Oncology*, 9(1), 210. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-9-210>
- Anagnostou, V. K., Syrigos, K. N., Bepler, G., Homer, R. J., & Rimm, D. L. (2009). Thyroid Transcription Factor 1 Is an Independent Prognostic Factor for Patients With Stage I Lung Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 271-278. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.0043>
- Anastasiadis, P. Z., & Reynolds, A. B. (2000). The p120 catenin family: Complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science*, 113(8), 1319-1334. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.8.1319>
- Antonini, D., Russo, M. T., De Rosa, L., Gorrese, M., Del Vecchio, L., & Missero, C. (2010). Transcriptional Repression of miR-34 Family Contributes to p63-Mediated Cell Cycle Progression in Epidermal Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1249-1257. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.438>
- Argani, P., Hicks, J., De Marzo, A. M., Albadine, R., Illei, P. B., Ladanyi, M., Reuter, V. E., & Netto, G. J. (2010). Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma (RCC): Extended Immunohistochemical Profile Emphasizing Novel RCC Markers. *American Journal*

*of Surgical Pathology*, 34(9), 1295-1303.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181e8ce5b>

Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., & Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer.

*The Lancet*, 371(9625), 1695-1709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X)

Arnold, B. N., Thomas, D. C., Rosen, J. E., Salazar, M. C., Blasberg, J. D., Boffa, D. J.,

Detterbeck, F. C., & Kim, A. W. (2016). Lung Cancer in the Very Young:

Treatment and Survival in the National Cancer Data Base. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(7), 1121-1131. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.03.023>

Attanoos, R. L. (2010). Asbestos-Related Lung Disease. *Surgical Pathology Clinics*, 3(1),

109-127. <https://doi.org/10.1016/j.path.2010.04.003>

Bailly, M., & Condeelis, J. (2002). Cell motility: Insights from the backstage. *Nature Cell*

*Biology*, 4(12), E292-E294. <https://doi.org/10.1038/ncb1202-e292>

Bao, X., Rubin, A. J., Qu, K., Zhang, J., Giresi, P. G., Chang, H. Y., & Khavari, P. A. (2015). A

novel ATAC-seq approach reveals lineage-specific reinforcement of the open chromatin landscape via cooperation between BAF and p63. *Genome Biology*, 16(1), 284. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0840-9>

Barreiro, E. (2008). [Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer]. *Archivos*

*De Bronconeumologia*, 44(8), 399-401.

Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer.

*Annals of Global Health*, 85(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>

Bass-Zubek, A. E., Godsel, L. M., Delmar, M., & Green, K. J. (2009). Plakophilins:

Multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5), 708-716. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.07.002>

- Beasley, M. B., Brambilla, E., & Travis, W. D. (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars in Roentgenology*, *40*(2), 90-97.  
<https://doi.org/10.1053/j.ro.2005.01.001>
- Bergethon, K., Shaw, A. T., Ignatius Ou, S.-H., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., Massion, P. P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E. J., Batten, J. M., Chen, H., Wilner, K. D., Kwak, E. L., Clark, J. W., Carbone, D. P., Ji, H., Engelman, J. A., ... Iafrate, A. J. (2012). *ROS1* Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(8), 863-870.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345>
- Bishop, J. A., Sharma, R., & Illei, P. B. (2010). Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Human Pathology*, *41*(1), 20-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.06.014>
- Bishop, J. A., Teruya-Feldstein, J., Westra, W. H., Pelosi, G., Travis, W. D., & Rekhtman, N. (2012). P40 ( $\Delta$ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*, *25*(3), 405-415.  
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.173>
- Bivona, T. G., & Doebele, R. C. (2016). A framework for understanding and targeting residual disease in oncogene-driven solid cancers. *Nature Medicine*, *22*(5), 472-478. <https://doi.org/10.1038/nm.4091>
- Bonne, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P., & van Roy, F. (1999). Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *112*(14), 2265-2276.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.112.14.2265>

- Bose, A., Teh, M.-T., Mackenzie, I., & Waseem, A. (2013). Keratin K15 as a Biomarker of Epidermal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 19385-19398. <https://doi.org/10.3390/ijms141019385>
- Bota, S., Auliac, J.-B., Paris, C., Métayer, J., Sesboué, R., Nouvet, G., & Thiberville, L. (2001). Follow-up of Bronchial Precancerous Lesions and Carcinoma *in Situ* Using Fluorescence Endoscopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*(9), 1688-1693. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.9.2012147>
- Bourdon, J. (2014). P53 isoforms change p53 paradigm. *Molecular & Cellular Oncology*, *1*(4), e969136. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.969136>
- Boyer, L., Martin-Padron, J., Fárez-Vidal, M. E., Rodriguez, M. I., Andrades, Á., Peinado, P., Arenas, A. M., Ritoré-Salazar, F., Alvarez-Perez, J. C., Cuadros, M., & Medina, P. P. (2022). PKP1 and MYC create a feedforward loop linking transcription and translation in squamous cell lung cancer. *Cellular Oncology*, *45*(2), 323-332. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00660-1>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brenner, D. R., McLaughlin, J. R., & Hung, R. J. (2011). Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *6*(3), e17479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017479>
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., ... Sadelain, M. (2013). CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults

- with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine*, 5(177). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930>
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (Eds.). (2017). *TNM classification of malignant tumours* (Eighth edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Brinkmeyer, J. K., & Moore, D. C. (2018). Necitumumab for the treatment of squamous cell non-small cell lung cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 24(1), 37-41. <https://doi.org/10.1177/1078155216682365>
- Brown, L., & Wan, H. (2015). Desmoglein 3: A Help or a Hindrance in Cancer Progression? *Cancers*, 7(1), 266-286. <https://doi.org/10.3390/cancers7010266>
- Buchbinder, E., & Hodi, F. S. (2015). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3377-3383. <https://doi.org/10.1172/JCI80012>
- Camacho, C. V., Choudhari, R., & Gadad, S. S. (2018). Long noncoding RNAs and cancer, an overview. *Steroids*, 133, 93-95. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.012>
- Caminero Luna, J. A., Fernández Fau, L., & Sociedad Española de Patología Respiratoria. (1998). *Manual de neumología y cirugía torácica*. Editores Médicos S.A.
- Campbell, J. D., Yau, C., Bowlby, R., Liu, Y., Brennan, K., Fan, H., Taylor, A. M., Wang, C., Walter, V., Akbani, R., Byers, L. A., Creighton, C. J., Coarfa, C., Shih, J., Cherniack, A. D., Gevaert, O., Prunello, M., Shen, H., Anur, P., ... Mariamidze, A. (2018). Genomic, Pathway Network, and Immunologic Features Distinguishing Squamous Carcinomas. *Cell Reports*, 23(1), 194-212.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.063>
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>

- Candi, E., Rufini, A., Terrinoni, A., Dinsdale, D., Ranalli, M., Paradisi, A., De Laurenzi, V., Spagnoli, L. G., Catani, M. V., Ramadan, S., Knight, R. A., & Melino, G. (2006). Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: Selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death & Differentiation*, *13*(6), 1037-1047. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401926>
- Caramori, G., Adcock, I. M., Casolari, P., Ito, K., Jazrawi, E., Tsaprouni, L., Villetti, G., Civelli, M., Carnini, C., Chung, K. F., Barnes, P. J., & Papi, A. (2011). Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: A link towards lung cancer. *Thorax*, *66*(6), 521-527. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.156448>
- Cardarella, S., Ogino, A., Nishino, M., Butaney, M., Shen, J., Lydon, C., Yeap, B. Y., Sholl, L. M., Johnson, B. E., & Jänne, P. A. (2013). Clinical, Pathologic, and Biologic Features Associated with *BRAF* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, *19*(16), 4532-4540. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0657>
- Carrassa, L., & Damia, G. (2017). DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, *60*, 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.013>
- Cayuela, A., Rodríguez-Domínguez, S., & Otero, R. (2006). Trends in Lung Cancer Mortality Rates in the Provinces of Andalusia, Spain, 1975-2002. *Archivos de Bronconeumología ((English Edition))*, *42*(12), 633-637. [https://doi.org/10.1016/S1579-2129\(07\)60005-6](https://doi.org/10.1016/S1579-2129(07)60005-6)
- Cheetham, S. W., Gruhl, F., Mattick, J. S., & Dinger, M. E. (2013). Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *British Journal of Cancer*, *108*(12), 2419-2425. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.233>

Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. (1995). *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 311(7010), 899-909.

Chen, L., & Han, X. (2015). Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3384-3391.  
<https://doi.org/10.1172/JCI80011>

Chen, W., & Miao, C. (2022). KRT15 promotes colorectal cancer cell migration and invasion through  $\beta$ -catenin/MMP-7 signaling pathway. *Medical Oncology*, 39(6), 68. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01619-2>

Chen, Y.-J., Chang, J. T., Lee, L., Wang, H.-M., Liao, C.-T., Chiu, C.-C., Chen, P.-J., & Cheng, A.-J. (2007). DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene*, 26(3), 467-476.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209802>

Chen, Y.-J., Lee, L.-Y., Chao, Y.-K., Chang, J. T., Lu, Y.-C., Li, H.-F., Chiu, C.-C., Li, Y.-C., Li, Y.-L., Chiou, J.-F., & Cheng, A.-J. (2013). DSG3 Facilitates Cancer Cell Growth and Invasion through the DSG3-Plakoglobin-TCF/LEF-Myc/Cyclin D1/MMP Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 8(5), e64088.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064088>

Chidgey, M., & Dawson, C. (2007). Desmosomes: A role in cancer? *British Journal of Cancer*, 96(12), 1783-1787. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603808>

Chung, C. H., Parker, J. S., Karaca, G., Wu, J., Funkhouser, W. K., Moore, D., Butterfoss, D., Xiang, D., Zanation, A., Yin, X., Shockley, W. W., Weissler, M. C., Dressler, L. G., Shores, C. G., Yarbrough, W. G., & Perou, C. M. (2004). Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5(5), 489-500. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00112-6)

- Civitareale, D., Castelli, M. P., Falasca, P., & Saiardi, A. (1993). Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 7(12), 1589-1595. <https://doi.org/10.1210/mend.7.12.8145764>
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A. J., & Di Lauro, R. (1989). A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *The EMBO Journal*, 8(9), 2537-2542. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08391.x>
- Cochran, A. J., Huang, R.-R., Lee, J., Itakura, E., Leong, S. P. L., & Essner, R. (2006). Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nature Reviews Immunology*, 6(9), 659-670. <https://doi.org/10.1038/nri1919>
- Conde E, Hernández S, Gómez-Román J, López-Ríos F. (2021). *Actualización de la determinación de biomarcadores con interés predictivo en el carcinoma de pulmón. En Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 7º ed. SEAP/IAP 2021: Vol. 7º Edición.*
- Coulombe, P. A., Tong, X., Mazzalupo, S., Wang, Z., & Wong, P. (2004). Great promises yet to be fulfilled: Defining keratin intermediate filament function in vivo. *European Journal of Cell Biology*, 83(11-12), 735-746. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00443>
- Coutandin, D., Löhr, F., Niesen, F. H., Ikeya, T., Weber, T. A., Schäfer, B., Zielonka, E. M., Bullock, A. N., Yang, A., Güntert, P., Knapp, S., McKeon, F., Ou, H. D., & Dötsch, V. (2009). Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death & Differentiation*, 16(12), 1582-1589. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.139>
- Dejmek, A., Naucler, P., Smedjebäck, A., Kato, H., Maeda, M., Yashima, K., Maeda, J., & Hirano, T. (2007). Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in

pleural effusions. *Diagnostic Cytopathology*, 35(8), 493-497.

<https://doi.org/10.1002/dc.20667>

Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (2009). The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2), a002543-a002543.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>

Devesa, S. S., Bray, F., Vizcaino, A. P., & Parkin, D. M. (2005). International lung cancer trends by histologic type: Male:Female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer*, 117(2), 294-299.

<https://doi.org/10.1002/ijc.21183>

Di Costanzo, A., Troiano, A., di Martino, O., Cacace, A., Natale, C. F., Ventre, M., Netti, P.,

Caserta, S., Pollice, A., La Mantia, G., & Calabrò, V. (2012). The p63 Protein

Isoform  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Modulates Y-box Binding Protein 1 in Its Subcellular

Distribution and Regulation of Cell Survival and Motility Genes. *Journal of*

*Biological Chemistry*, 287(36), 30170-30180.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349951>

D'Jaen, G. A., Pantanowitz, L., Bower, M., Buskin, S., Neil, N., Greco, E. M., Cooley, T. P.,

Henry, D., Stem, J., Dezube, B. J., Stebbing, J., & Aboulafia, D. M. (2010). Human

Immunodeficiency Virus–Associated Primary Lung Cancer in the Era of Highly

Active Antiretroviral Therapy: A Multi-Institutional Collaboration. *Clinical Lung*

*Cancer*, 11(6), 396-404. <https://doi.org/10.3816/CLC.2010.n.051>

Dohn, M., Zhang, S., & Chen, X. (2001). P63 $\alpha$  and  $\Delta$ Np63 $\alpha$  can induce cell cycle arrest

and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*, 20(25),

3193-3205. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204427>

Dougherty, S. M., Mazhawidza, W., Bohn, A. R., Robinson, K. A., Mattingly, K. A.,

Blankenship, K. A., Huff, M. O., McGregor, W. G., & Klinge, C. M. (2006). Gender

difference in the activity but not expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in

- human lung adenocarcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer*, 13(1), 113-134.  
<https://doi.org/10.1677/erc.1.01118>
- Drake, C. G., Jaffee, E., & Pardoll, D. M. (2006). Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. En *Advances in Immunology* (Vol. 90, pp. 51-81). Elsevier.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90002-9)
- Dusek, R. L., & Attardi, L. D. (2011). Desmosomes: New perpetrators in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 317-323.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3051>
- Eberhardt, W. E. E., Mitchell, A., Crowley, J., Kondo, H., Kim, Y. T., Turrisi, A., Goldstraw, P., & Rami-Porta, R. (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(11), 1515-1522.  
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000673>
- Emens, L. A., Ascierto, P. A., Darcy, P. K., Demaria, S., Eggermont, A. M. M., Redmond, W. L., Seliger, B., & Marincola, F. M. (2017). Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *European Journal of Cancer*, 81, 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.035>
- Fang, W.-K., Chen, B., Xu, X.-E., Liao, L.-D., Wu, Z.-Y., Wu, J.-Y., Shen, J., Xu, L.-Y., & Li, E.-M. (2014). Altered expression and localization of desmoglein 3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Histochemica*, 116(5), 803-809.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.01.010>
- Fang, W.-K., Gu, W., Liao, L.-D., Chen, B., Wu, Z.-Y., Wu, J.-Y., Shen, J., Xu, L.-Y., & Li, E.-M. (2014). Prognostic Significance of Desmoglein 2 and Desmoglein 3 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 871-876. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.871>

- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. *Journal of Cell Biology*, 17(2), 375-412.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>
- Fatima, N., Cohen, C., Lawson, D., & Siddiqui, M. T. (2011). TTF-1 and Napsin A double stain: A useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell blocks. *Cancer Cytopathology*, 119(2), 127-133.  
<https://doi.org/10.1002/cncy.20135>
- Ferris, R. L., Xi, L., Raja, S., Hunt, J. L., Wang, J., Gooding, W. E., Kelly, L., Ching, J., Luketich, J. D., & Godfrey, T. E. (2005). Molecular Staging of Cervical Lymph Nodes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Research*, 65(6), 2147-2156. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3717>
- Ferris, R. L., Xi, L., Seethala, R. R., Chan, J., Desai, S., Hoch, B., Gooding, W., & Godfrey, T. E. (2011). Intraoperative qRT-PCR for Detection of Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(7), 1858-1866.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3110>
- Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*, 23, viii6-viii9.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds256>
- Fischer-Kešo, R., Breuninger, S., Hofmann, S., Henn, M., Röhrig, T., Ströbel, P., Stoecklin, G., & Hofmann, I. (2014). Plakophilins 1 and 3 Bind to FXR1 and Thereby Influence the mRNA Stability of Desmosomal Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 34(23), 4244-4256. <https://doi.org/10.1128/MCB.00766-14>
- Franke, W. W., Weber, K., Osborn, M., Schmid, E., & Freudenstein, C. (1978). Antibody to prekeratin. *Experimental Cell Research*, 116(2), 429-445.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(78\)90466-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(78)90466-4)

- Fuchs, E. (1996). THE CYTOSKELETON AND DISEASE: Genetic Disorders of Intermediate Filaments. *Annual Review of Genetics*, 30(1), 197-231.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.197>
- Fukuoka, J., Dracheva, T., Shih, J. H., Hewitt, S. M., Fujii, T., Kishor, A., Mann, F., Shilo, K., Franks, T. J., Travis, W. D., & Jen, J. (2007). Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Human Pathology*, 38(2), 276-283.  
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.08.006>
- Gainor, J. F., Tan, D. S. W., De Pas, T., Solomon, B. J., Ahmad, A., Lazzari, C., de Marinis, F., Spitaleri, G., Schultz, K., Friboulet, L., Yeap, B. Y., Engelman, J. A., & Shaw, A. T. (2015). Progression-Free and Overall Survival in ALK-Positive NSCLC Patients Treated with Sequential Crizotinib and Ceritinib. *Clinical Cancer Research*, 21(12), 2745-2752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3009>
- Galindo, I., Gómez-Morales, M., Díaz-Cano, I., Andrades, Á., Caba-Molina, M., Miranda-León, M. T., Medina, P. P., Martín-Padron, J., & Fárez-Vidal, M. E. (2020). The value of desmosomal plaque-related markers to distinguish squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 125(1), 19-29. <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1692101>
- Garraway, L. A., & Jänne, P. A. (2012). Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine. *Cancer Discovery*, 2(3), 214-226.  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0012>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 572-587.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D., & Taberner, L. (2005). Hyperadhesion in desmosomes: Its regulation in wound healing and possible

- relationship to cadherin crystal structure. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5743-5754. <https://doi.org/10.1242/jcs.02700>
- Garrod, D. R., Merritt, A. J., & Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 537-545. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00366-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00366-6)
- Geisler, N., Schunemann, J., & Weber, K. (1992). Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *European Journal of Biochemistry*, 206(3), 841-852. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16992.x>
- Ghioni, P., Bolognese, F., Duijf, P. H. G., van Bokhoven, H., Mantovani, R., & Guerrini, L. (2002). Complex Transcriptional Effects of p63 Isoforms: Identification of Novel Activation and Repression Domains<sup>†</sup>. *Molecular and Cellular Biology*, 22(24), 8659-8668. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.24.8659-8668.2002>
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., Ball, D., Beer, D. G., Beyruti, R., Bolejack, V., Chansky, K., Crowley, J., ... Yokoi, K. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
- Gómez González, C., & Pérez Castán, J. F. (2007). Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 33(10), 509-519. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73955-2](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73955-2)
- Gómez-Morales, M., Cámara-Pulido, M., Miranda-León, M. T., Sánchez-Palencia, A., Boyero, L., Gómez-Capilla, J. A., & Fárez-Vidal, M. E. (2013). Differential immunohistochemical localization of desmosomal plaque-related proteins in

non-small-cell lung cancer. *Histopathology*, 63(1), 103-113.

<https://doi.org/10.1111/his.12126>

Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N. D., Kanchi, K. L., Maher, C.

A., Fulton, R., Fulton, L., Wallis, J., Chen, K., Walker, J., McDonald, S., Bose, R.,

Ornitz, D., Xiong, D., You, M., Dooling, D. J., Watson, M., ... Wilson, R. K. (2012).

Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-

Smokers. *Cell*, 150(6), 1121-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.024>

Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-

313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>

Green, K. J., & Gaudry, C. A. (2000). Are desmosomes more than tethers for

intermediate filaments? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(3), 208-216.

<https://doi.org/10.1038/35043032>

Green, K. J., Jaiganesh, A., & Broussard, J. A. (2019). Desmosomes: Essential contributors

to an integrated intercellular junction network. *F1000Research*, 8, 2150.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.20942.1>

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D.

T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L., & June, C. H.

(2013). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid

Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 368(16), 1509-1518.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>

Gu, L.-H., & Coulombe, P. A. (2007). Keratin function in skin epithelia: A broadening

palette with surprising shades. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(1), 13-23.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.12.007>

Guan, L., Zhao, X., Tang, L., Chen, J., Zhao, J., Guo, M., Chen, C., Zhou, Y., & Xu, L. (2021).

Thyroid Transcription Factor-1: Structure, Expression, Function and Its

Relationship with Disease. *BioMed Research International*, 2021, 1-10.

<https://doi.org/10.1155/2021/9957209>

Hagiwara, K., McMenemy, M. G., Miura, K., & Harris, C. C. (1999). Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Research*, 59(17), 4165-4169.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hanukoglu, I., & Fuchs, E. (1982). The cDNA sequence of a human epidermal keratin: Divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. *Cell*, 31(1), 243-252. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90424-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90424-X)

Hanukoglu, I., & Fuchs, E. (1983). The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins. *Cell*, 33(3), 915-924. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90034-X)

Hatzfeld, M. (2005). The p120 family of cell adhesion molecules. *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.016>

Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(1), 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.009>

Hatzfeld, M. (2010). A Nuclear Function for Plakophilin-1 in the DNA Damage Response? *Journal of Investigative Dermatology*, 130(11), 2538-2540.

<https://doi.org/10.1038/jid.2010.258>

Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K., & Vinzens, U. (2000). The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. *Journal of Cell Biology*, 149(1), 209-222. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.209>

- Hatzfeld, M., Kristjansson, G. I., Plessmann, U., & Weber, K. (1994). Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *Journal of Cell Science*, *107*(8), 2259-2270. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.8.2259>
- Hatzfeld, M., Wolf, A., & Keil, R. (2014). Plakophilins in Desmosomal Adhesion and Signaling. *Cell Communication & Adhesion*, *21*(1), 25-42. <https://doi.org/10.3109/15419061.2013.876017>
- Heid, H. W., Werner, E., & Franke, W. W. (1986). The complement of native  $\alpha$ -keratin polypeptides of hair-forming cells: A subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. *Differentiation*, *32*(2), 101-119. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00562.x>
- Helton, E. S., Zhu, J., & Chen, X. (2006). The Unique NH<sub>2</sub>-terminally Deleted ( $\Delta$ N) Residues, the PXXP Motif, and the PPXY Motif Are Required for the Transcriptional Activity of the  $\Delta$ N Variant of p63. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(5), 2533-2542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507964200>
- Hesse, M., Magin, T. M., & Weber, K. (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome. *Journal of Cell Science*, *114*(14), 2569-2575. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.14.2569>
- Hirano, T. (2003). Usefulness of TA02 (Napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, *41*(2), 155-162. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(03\)00194-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(03)00194-6)
- Hirano, T., Auer, G., Maeda, M., Hagiwara, Y., Okada, S., Ohira, T., Okuzawa, K., Fujioka, K., Franzén, B., Hibi, N., Seito, T., Ebihara, Y., & Kato, H. (2000). Human Tissue Distribution of TA02, Which is Homologous with a New Type of Aspartic Proteinase, Napsin A. *Japanese Journal of Cancer Research*, *91*(10), 1015-1021. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00879.x>

- Hobbs, R. P., Jacob, J. T., & Coulombe, P. A. (2016). Keratins Are Going Nuclear. *Developmental Cell*, 38(3), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.022>
- Hofmann, I., Casella, M., Schnölzer, M., Schlechter, T., Spring, H., & Franke, W. W. (2006). Identification of the Junctional Plaque Protein Plakophilin 3 in Cytoplasmic Particles Containing RNA-binding Proteins and the Recruitment of Plakophilins 1 and 3 to Stress Granules. *Molecular Biology of the Cell*, 17(3), 1388-1398. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0708>
- Hokari, S., Tamura, Y., Kaneda, A., Katsura, A., Morikawa, M., Murai, F., Ehata, S., Tsutsumi, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Kikuchi, T., Miyazono, K., & Koinuma, D. (2020). Comparative analysis of TTF-1 binding DNA regions in small-cell lung cancer and non-small-cell lung cancer. *Molecular Oncology*, 14(2), 277-293. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12608>
- Hong, Y.-S., Song, K.-H., & Chung, J.-Y. (2014). Health Effects of Chronic Arsenic Exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 47(5), 245-252. <https://doi.org/10.3961/jpmph.14.035>
- Horie, M., Miyashita, N., Mattsson, J. S. M., Mikami, Y., Sandelin, M., Brunnström, H., Micke, P., Nagase, T., & Saito, A. (2018). An integrative transcriptome analysis reveals a functional role for thyroid transcription factor-1 in small cell lung cancer: A role for TTF-1 in SCLC. *The Journal of Pathology*, 246(2), 154-165. <https://doi.org/10.1002/path.5109>
- Howington, J. A., Blum, M. G., Chang, A. C., Balekian, A. A., & Murthy, S. C. (2013). Treatment of Stage I and II Non-small Cell Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e278S-e313S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2359>
- Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M. J., Meza, R., Kong, C. Y., Cronin, K. A., Mariotto, A. B., Lowy, D. R., & Feuer, E. J. (2020). The Effect of Advances in Lung-Cancer

- Treatment on Population Mortality. *New England Journal of Medicine*, 383(7), 640-649. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916623>
- Huang, C.-C., Lee, T.-J., Chang, P.-H., Lee, Y.-S., Chuang, C.-C., Jhang, Y.-J., Chen, Y.-W., Chen, C.-W., & Tsai, C.-N. (2009). Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity. *The Laryngoscope*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/lary.20151>
- Ihrie, R. A., Marques, M. R., Nguyen, B. T., Horner, J. S., Papazoglu, C., Bronson, R. T., Mills, A. A., & Attardi, L. D. (2005). Perp Is a p63-Regulated Gene Essential for Epithelial Integrity. *Cell*, 120(6), 843-856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.008>
- Ikeda, K., Clark, J. C., Shaw-White, J. R., Stahlman, M. T., Boutell, C. J., & Whitsett, J. A. (1995). Gene Structure and Expression of Human Thyroid Transcription Factor-1 in Respiratory Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8108-8114. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8108>
- Ikeda, K., Shaw-White, J. R., Wert, S. E., & Whitsett, J. A. (1996). Hepatocyte nuclear factor 3 activates transcription of thyroid transcription factor 1 in respiratory epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7), 3626-3636. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.3626>
- Inamura, K. (2018). Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers*, 10(3), 72. <https://doi.org/10.3390/cancers10030072>
- Inamura, K., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Tsuchiya, E., Fukayama, M., & Ishikawa, Y. (2005). Pulmonary Adenocarcinomas With Enteric Differentiation: Histologic and Immunohistochemical Characteristics Compared With Metastatic Colorectal Cancers and Usual Pulmonary Adenocarcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*, 29(5), 660-665. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000160438.00652.8b>

- Jamal, A., Phillips, E., Gentzke, A. S., Homa, D. M., Babb, S. D., King, B. A., & Neff, L. J. (2018). Current Cigarette Smoking Among Adults—United States, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *67*(2), 53-59. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6702a1>
- James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2021). *An introduction to statistical learning: With applications in R* (Second edition). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1418-1>
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.-C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.-M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., & Caput, D. (1997). Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell*, *90*(4), 809-819. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80540-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80540-1)
- Kalemkerian, G. P., Narula, N., Kennedy, E. B., Biermann, W. A., Donington, J., Leighl, N. B., Lew, M., Pantelas, J., Ramalingam, S. S., Reck, M., Saqi, A., Simoff, M., Singh, N., & Sundaram, B. (2018). Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(9), 911-919. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.7293>
- Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., & June, C. H. (2011). T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine*, *3*(95). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002842>

- Kapprell, H. P., Owaribe, K., & Franke, W. W. (1988). Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *Journal of Cell Biology*, *106*(5), 1679-1691.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1679>
- Kashyap, S., Shanker, V., & Sharma, N. (2015). Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome: A rare case report. *Indian Journal of Dermatology*, *60*(4), 421.  
<https://doi.org/10.4103/0019-5154.160525>
- Kaufmann & Dietel. (2000). Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B: Markers for pulmonary carcinomas. *Histopathology*, *36*(1), 8-16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00801.x>
- Kazan-Allen, L. (2005). Asbestos and mesothelioma: Worldwide trends. *Lung Cancer*, *49*, S3-S8. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.03.002>
- Kendall, J., Liu, Q., Bakleh, A., Krasnitz, A., Nguyen, K. C. Q., Lakshmi, B., Gerald, W. L., Powers, S., & Mu, D. (2007). Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(42), 16663-16668.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0708286104>
- Kerr, K. M. (2012). Personalized medicine for lung cancer: New challenges for pathology: Tailoring lung cancer diagnosis. *Histopathology*, *60*(4), 531-546.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03854.x>
- Kim, H. R., Kim, W. S., Choi, Y. J., Choi, C. M., Rho, J. K., & Lee, J. C. (2013). Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation. *Molecular Oncology*, *7*(6), 1093-1102.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.08.001>

- Kimura, T. E., Merritt, A. J., & Garrod, D. R. (2007). Calcium-Independent Desmosomes of Keratinocytes are Hyper-Adhesive. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*(4), 775-781. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700643>
- Kimura, T. E., Merritt, A. J., Lock, F. R., Eckert, J. J., Fleming, T. P., & Garrod, D. R. (2012). Desmosomal adhesiveness is developmentally regulated in the mouse embryo and modulated during trophectoderm migration. *Developmental Biology*, *369*(2), 286-297. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.025>
- King, K. E., Ponnamperna, R. M., Allen, C., Lu, H., Duggal, P., Chen, Z., Van Waes, C., & Weinberg, W. C. (2008). The p53 Homologue  $\Delta Np63\alpha$  Interacts with the Nuclear Factor- $\kappa B$  Pathway to Modulate Epithelial Cell Growth. *Cancer Research*, *68*(13), 5122-5131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6123>
- Kligerman, S., & White, C. (2011). Epidemiology of Lung Cancer in Women: Risk Factors, Survival, and Screening. *American Journal of Roentgenology*, *196*(2), 287-295. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.5412>
- Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., & Roop, D. R. (2004). P63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*, *18*(2), 126-131. <https://doi.org/10.1101/gad.1165104>
- Koster, M. I., Marinari, B., Payne, A. S., Kantaputra, P. N., Costanzo, A., & Roop, D. R. (2009).  $\Delta Np63$  knockdown mice: A mouse model for AEC syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *149A*(9), 1942-1947. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32794>
- Kouwenhoven, E. N., Oti, M., Niehues, H., van Heeringen, S. J., Schalkwijk, J., Stunnenberg, H. G., Bokhoven, H., & Zhou, H. (2015). Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation. *EMBO Reports*, *16*(7), 863-878. <https://doi.org/10.15252/embr.201439941>

- Kowalczyk, A. P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E. A., Kopp, D. S., Borgwardt, J. E., Corcoran, C. M., Settler, A., & Green, K. J. (1999). The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18145-18148.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18145>
- Krewski, D., Lubin, J. H., Zielinski, J. M., Alavanja, M., Catalan, V. S., William Field, R., Klotz, J. B., Létourneau, E. G., Lynch, C. F., Lyon, J. L., Sandler, D. P., Schoenberg, J. B., Steck, D. J., Stolwijk, J. A., Weinberg, C., & Wilcox, H. B. (2006). A Combined Analysis of North American Case-Control Studies of Residential Radon and Lung Cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(7-8), 533-597. <https://doi.org/10.1080/15287390500260945>
- Ku, N.-O., Strnad, P., Zhong, B.-H., Tao, G.-Z., & Omary, M. B. (2007). Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology*, 46(5), 1639-1649. <https://doi.org/10.1002/hep.21976>
- Kuller, L. H., Ockene, J., Meilahn, E., & Svendsen, K. H. (1990). RELATION OF FORCED EXPIRATORY VOLUME IN ONE SECOND (FEV1) TO LUNG CANCER MORTALITY IN THE MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL (MRFIT). *American Journal of Epidemiology*, 132(2), 265-274.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115656>
- Kumar, R., Collins, D., Dolly, S., McDonald, F., O'Brien, M. E. R., & Yap, T. A. (2017). Targeting the PD-1/PD-L1 axis in non-small cell lung cancer. *Current Problems in Cancer*, 41(2), 111-124. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2016.12.002>
- Kurokawa, I., Takahashi, K., Moll, I., & Moll, R. (2011). Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders - distribution and clinical significance: Keratin expression in cutaneous epithelial tumors. *Experimental*

*Dermatology*, 20(3), 217-228. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01006.x>

0625.2009.01006.x

Kwei, K. A., Kim, Y. H., Girard, L., Kao, J., Pacyna-Gengelbach, M., Salari, K., Lee, J., Choi,

Y.-L., Sato, M., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Gazdar, A. F., Petersen, I.,

Minna, J. D., & Pollack, J. R. (2008). Genomic profiling identifies TITF1 as a

lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene*, 27(25), 3635-

3640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211012>

Laury, A. R., Hornick, J. L., Perets, R., Krane, J. F., Corson, J., Drapkin, R., & Hirsch, M. S.

(2010). PAX8 Reliably Distinguishes Ovarian Serous Tumors From Malignant

Mesothelioma. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(5), 627-635.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181da7687>

Laury, A. R., Perets, R., Piao, H., Krane, J. F., Barletta, J. A., French, C., Chirieac, L. R., Lis,

R., Loda, M., Hornick, J. L., Drapkin, R., & Hirsch, M. S. (2011). A Comprehensive

Analysis of PAX8 Expression in Human Epithelial Tumors. *American Journal of*

*Surgical Pathology*, 35(6), 816-826.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318216c112>

Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold*

*Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), a003236-a003236.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>

Lefort, K., Brooks, Y., Ostano, P., Cario-André, M., Calpini, V., Guinea-Viniegra, J.,

Albinger-Hegy, A., Hoetzenecker, W., Kolfshoten, I., Wagner, E. F., Werner, S.,

& Dotto, G. P. (2013). A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation

network. *The EMBO Journal*, 32(16), 2248-2263.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.156>

Leiro-Fernández, V., Mouronte-Roibás, C., Ramos-Hernández, C., Botana-Rial, M.,

González-Piñeiro, A., García-Rodríguez, E., Represas-Represas, C., & Fernández-

- Villar, A. (2014). Cambios en el estadio y presentación clínica del cáncer de pulmón a lo largo de dos décadas. *Archivos de Bronconeumología*, 50(10), 417-421. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.03.003>
- Li, X., Cao, Y., Gong, X., & Li, H. (2017). Long noncoding RNAs in head and neck cancer. *Oncotarget*, 8(6), 10726-10740. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12960>
- Li, Y., Eggermont, K., Vanslebrouck, V., & Verfaillie, C. M. (2013). NKX2-1 Activation by SMAD2 Signaling After Definitive Endoderm Differentiation in Human Embryonic Stem Cell. *Stem Cells and Development*, 22(9), 1433-1442. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0620>
- Li, Y. Y., Hanna, G. J., Laga, A. C., Haddad, R. I., Lorch, J. H., & Hammerman, P. S. (2015). Genomic Analysis of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 21(6), 1447-1456. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1773>
- Lin, J., Feng, Z., Qiu, M., Luo, R., Li, X., & Liu, B. (2020). KRT 15 as a prognostic biomarker is highly expressed in esophageal carcinoma. *Future Oncology*, 16(25), 1903-1909. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0603>
- Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., Colasacco, C., Dacic, S., Hirsch, F. R., Kerr, K., Kwiatkowski, D. J., Ladanyi, M., Nowak, J. A., Sholl, L., Temple-Smolkin, R., Solomon, B., Souter, L. H., Thunnissen, E., Tsao, M. S., ... Yatabe, Y. (2018). Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(3), 323-358. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.12.001>
- Liu, P., He, K., Li, Y., Wu, Q., Yang, P., & Wang, D. (2012). Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in

nematodes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 90-100.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.007>

Liu, Y.-Q., Zou, H.-Y., Xie, J.-J., & Fang, W.-K. (2021). Paradoxical Roles of Desmosomal Components in Head and Neck Cancer. *Biomolecules*, 11(6), 914.

<https://doi.org/10.3390/biom11060914>

Liu, Z.-Q., Tian, Y.-Q., Ma, F.-R., Zhu, L., & Hu, Y.-F. (2007). [Expression of desmoglein 3 in nasopharyngeal carcinoma: Research of 22 cases]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87(36), 2541-2543.

Long, K. B., Srivastava, A., Hirsch, M. S., & Hornick, J. L. (2010). PAX8 Expression in Well-differentiated Pancreatic Endocrine Tumors: Correlation With Clinicopathologic Features and Comparison With Gastrointestinal and Pulmonary Carcinoid Tumors. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(5), 723-729.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181da0a20>

Loo, P. S., Thomas, S. C., Nicolson, M. C., Fyfe, M. N., & Kerr, K. M. (2010). Subtyping of Undifferentiated Non-small Cell Carcinomas in Bronchial Biopsy Specimens. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(4), 442-447.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d40fac>

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129-2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>

Maddox, P., Sasieni, P., Szarewski, A., Anderson, M., & Hanby, A. (1999). Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical

- intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 52(1), 41-46. <https://doi.org/10.1136/jcp.52.1.41>
- Magin, T. M., Vijayaraj, P., & Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2021-2032. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.005>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2017). European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Annals of Oncology*, 28(5), 1117-1123. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx033>
- Man Tsang, S., Brown, L., Gadmor, H., Gammon, L., Fortune, F., Wheeler, A., & Wan, H. (2012). Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Experimental Cell Research*, 318(18), 2269-2283. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.002>
- Mangiulli, M., Valletti, A., Caratozzolo, M. F., Tullo, A., Sbisà, E., Pesole, G., & D'Erchia, A. M. (2009). Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. *Nucleic Acids Research*, 37(18), 6092-6104. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp674>
- Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., & Buttitta, F. (2011). Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(26), 3574-3579. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.9638>
- Markowitz, S. B., Levin, S. M., Miller, A., & Morabia, A. (2013). Asbestos, Asbestosis, Smoking, and Lung Cancer. New Findings from the North American Insulator Cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(1), 90-96. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0257OC>

- Marques, M. R., Ihrie, R. A., Horner, J. S., & Attardi, L. D. (2006). The Requirement for Perp in Postnatal Viability and Epithelial Integrity Reflects an Intrinsic Role in Stratified Epithelia. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 69-73. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700032>
- Marshall, C. B., Mays, D. J., Beeler, J. S., Rosenbluth, J. M., Boyd, K. L., Santos Guasch, G. L., Shaver, T. M., Tang, L. J., Liu, Q., Shyr, Y., Venters, B. J., Magnuson, M. A., & Pietenpol, J. A. (2016). P73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Reports*, 14(10), 2289-2300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.035>
- Martin-Padron, J., Boyero, L., Rodriguez, M. I., Andrades, A., Díaz-Cano, I., Peinado, P., Baliñas-Gavira, C., Alvarez-Perez, J. C., Coira, I. F., Fárez-Vidal, M. E., & Medina, P. P. (2020). Plakophilin 1 enhances MYC translation, promoting squamous cell lung cancer. *Oncogene*, 39(32), 5479-5493. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1129-3>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Masters, G. A., Temin, S., Azzoli, C. G., Giaccone, G., Baker, S., Brahmer, J. R., Ellis, P. M., Gajra, A., Rackear, N., Schiller, J. H., Smith, T. J., Strawn, J. R., Trent, D., & Johnson, D. H. (2015). Systemic Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 33(30), 3488-3515. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1342>
- Matoso, A., Singh, K., Jacob, R., Greaves, W. O., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M. B., DeLellis, R. A., & Wang, L. J. (2010). Comparison of Thyroid Transcription Factor-1 Expression by 2 Monoclonal Antibodies in Pulmonary and Nonpulmonary

- Primary Tumors. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 18(2), 142-149. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181bdf4e7>
- McGrath, J. A., & Mellerio, J. E. (2010). Ectodermal Dysplasia-Skin Fragility Syndrome. *Dermatologic Clinics*, 28(1), 125-129. <https://doi.org/10.1016/j.det.2009.10.014>
- McLachlan, A. D. (1978). Coiled coil formation and sequence regularities in the helical regions of  $\alpha$ -keratin. *Journal of Molecular Biology*, 124(1), 297-304. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90163-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90163-8)
- McLean, W. H. I., & Irvine, A. D. (2007). Disorders of keratinisation: From rare to common genetic diseases of skin and other epithelial tissues. *The Ulster Medical Journal*, 76(2), 72-82.
- Melino, G., Memmi, E. M., Pelicci, P. G., & Bernassola, F. (2015). Maintaining epithelial stemness with p63. *Science Signaling*, 8(387). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa1033>
- Merritt, A. J., Berika, M. Y., Zhai, W., Kirk, S. E., Ji, B., Hardman, M. J., & Garrod, D. R. (2002). Suprabasal Desmoglein 3 Expression in the Epidermis of Transgenic Mice Results in Hyperproliferation and Abnormal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(16), 5846-5858. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.16.5846-5858.2002>
- Mertens, C., Kuhn, C., & Franke, W. W. (1996). Plakophilins 2a and 2b: Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *Journal of Cell Biology*, 135(4), 1009-1025. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.1009>
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X.-J., Vogel, H., Roop, D. R., & Bradley, A. (1999). P63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398(6729), 708-713. <https://doi.org/10.1038/19531>
- Minoo, P., Hu, L., Xing, Y., Zhu, N. L., Chen, H., Li, M., Borok, Z., & Li, C. (2007). Physical and Functional Interactions between Homeodomain NKX2.1 and Winged

- Helix/Forkhead FOXA1 in Lung Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2155-2165. <https://doi.org/10.1128/MCB.01133-06>
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
- Moll, R., Schiller, D. L., & Franke, W. W. (1990). Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *Journal of Cell Biology*, 111(2), 567-580. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.2.567>
- Mori, K., Kon, Y., Konno, A., & Iwanaga, T. (2001). Cellular Distribution of Napsin (Kidney-Derived Aspartic Protease-like Protein, KAP) mRNA in the Kidney, Lung and Lymphatic Organs of Adult and Developing Mice. *Archives of Histology and Cytology*, 64(3), 319-327. <https://doi.org/10.1679/aohc.64.319>
- Mori, K., Shimizu, H., Konno, A., & Iwanaga, T. (2002). Immunohistochemical Localization of Napsin and Its Potential Role in Protein Catabolism in Renal Proximal Tubules. *Archives of Histology and Cytology*, 65(4), 359-368. <https://doi.org/10.1679/aohc.65.359>
- Morton, D. L., & Cochran, A. J. (2004). The case for lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in the management of primary melanoma. *British Journal of Dermatology*, 151(2), 308-319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06133.x>
- Moses, M. A., George, A. L., Sakakibara, N., Mahmood, K., Ponnampuruma, R. M., King, K. E., & Weinberg, W. C. (2019). Molecular Mechanisms of p63-Mediated

- Squamous Cancer Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3590. <https://doi.org/10.3390/ijms20143590>
- Mountain, C. F. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*, 111(6), 1710-1717. <https://doi.org/10.1378/chest.111.6.1710>
- Mukhopadhyay, S., & Katzenstein, A.-L. A. (2011a). Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens: Utility of an Immunohistochemical Panel Containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK5/6. *American Journal of Surgical Pathology*, 35(1), 15-25. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182036d05>
- Mukhopadhyay, S., & Katzenstein, A.-L. A. (2011b). Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens: Utility of an Immunohistochemical Panel Containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK5/6. *American Journal of Surgical Pathology*, 35(1), 15-25. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182036d05>
- Neuber, S., Mühmer, M., Wratten, D., Koch, P. J., Moll, R., & Schmidt, A. (2010). The Desmosomal Plaque Proteins of the Plakophilin Family. *Dermatology Research and Practice*, 2010, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2010/101452>
- Nguyen, L. Q., Kopp, P., Martinson, F., Stanfield, K., Roth, S. I., & Jameson, J. L. (2000). A Dominant Negative CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) Isoform Inhibits Thyrocyte Growth, Thyroid-Specific Gene Expression, Differentiation, and Function. *Molecular Endocrinology*, 14(9), 1448-1461. <https://doi.org/10.1210/mend.14.9.0516>
- Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since

2015. *Journal of Thoracic Oncology*, 17(3), 362-387.

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>

- Niederst, M. J., Sequist, L. V., Poirier, J. T., Mermel, C. H., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., Katayama, R., Costa, C., Ross, K. N., Moran, T., Howe, E., Fulton, L. E., Mulvey, H. E., Bernardo, L. A., Mohamoud, F., Miyoshi, N., VanderLaan, P. A., Costa, D. B., Jänne, P. A., ... Engelman, J. A. (2015). RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nature Communications*, 6(1), 6377. <https://doi.org/10.1038/ncomms7377>
- Nielsen, L. S., Bælum, J., Rasmussen, J., Dahl, S., Olsen, K. E., Albin, M., Hansen, N. C., & Sherson, D. (2014). Occupational Asbestos Exposure and Lung Cancer—A Systematic Review of the Literature. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 69(4), 191-206. <https://doi.org/10.1080/19338244.2013.863752>
- Nonaka, D., Chiriboga, L., & Soslow, R. A. (2008). Expression of Pax8 as a Useful Marker in Distinguishing Ovarian Carcinomas From Mammary Carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*, 32(10), 1566-1571. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31816d71ad>
- Nonaka, D., Tang, Y., Chiriboga, L., Rivera, M., & Ghossein, R. (2008). Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Modern Pathology*, 21(2), 192-200. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3801002>
- Odland, G. F. (1958). The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(5), 529-538.
- Oguchi, H., & Kimura, S. (1998). Multiple Transcripts Encoded by the Thyroid-Specific Enhancer-Binding Protein (T/EBP)/Thyroid-Specific Transcription Factor-1 (TTF-1) Gene: Evidence of Autoregulation\*. *Endocrinology*, 139(4), 1999-2006. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5933>

- Oktaç, E., Oflazoglu, U., Varol, Y., Tanriverdi, O., Mermur, N., Arda, H., Demir, L., Keskin, O., Ahmadli, T., Somali, I., Oztop, I., & Meydan, N. (2020). The prognostic role of thyroid transcription factor-1 in lung adenocarcinoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(4), 737. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_1404\\_16](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1404_16)
- Ordóñez, N. G. (2003). Application of Mesothelin Immunostaining in Tumor Diagnosis: *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(11), 1418-1428. <https://doi.org/10.1097/00000478-200311000-00003>
- Ordóñez, N. G. (2007). What are the current best immunohistochemical markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma? A review and update. *Human Pathology*, 38(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.08.010>
- Ordóñez, N. G. (2012). A Word of Caution Regarding Napsin A Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *American Journal of Surgical Pathology*, 36(3), 396-401. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31823b13e2>
- Organisation mondiale de la santé & Centre international de recherche sur le cancer (Eds.). (2015a). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. International agency for research on cancer.
- Organisation mondiale de la santé, & Centre international de recherche sur le cancer (Eds.). (2015b). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. International agency for research on cancer.
- Organisation mondiale de la santé, & Centre international de recherche sur le cancer (Eds.). (2021). *Thoracic tumours* (5th ed). International agency for research on cancer.
- Ortt, K., & Sinha, S. (2006). Derivation of the consensus DNA-binding sequence for p63 reveals unique requirements that are distinct from p53. *FEBS Letters*, 580(18), 4544-4550. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.004>

- Ory, B., Ramsey, M. R., Wilson, C., Vadysirisack, D. D., Forster, N., Rocco, J. W., Rothenberg, S. M., & Ellisen, L. W. (2011). A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 809-820. <https://doi.org/10.1172/JCI43897>
- Osada, M., Park, H. L., Nagakawa, Y., Yamashita, K., Fomenkov, A., Kim, M. S., Wu, G., Nomoto, S., Trink, B., & Sidransky, D. (2005). Differential Recognition of Response Elements Determines Target Gene Specificity for p53 and p63. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6077-6089. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6077-6089.2005>
- Oshima, R. G. (2007). Intermediate filaments: A historical perspective. *Experimental Cell Research*, 313(10), 1981-1994. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.007>
- Owens, D. W., & Lane, E. B. (2003). The quest for the function of simple epithelial keratins. *BioEssays*, 25(8), 748-758. <https://doi.org/10.1002/bies.10316>
- Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E., & Meyerson, M. (2004). *EGFR* Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, 304(5676), 1497-1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>
- Pakkala, S., & Ramalingam, S. S. (2018). Personalized therapy for lung cancer: Striking a moving target. *JCI Insight*, 3(15), e120858. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120858>
- Palma-Lara, I., Martínez-Castillo, M., Quintana-Pérez, J. C., Arellano-Mendoza, M. G., Tamay-Cach, F., Valenzuela-Limón, O. L., García-Montalvo, E. A., & Hernández-Zavala, A. (2020). Arsenic exposure: A public health problem leading to several

cancers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 110, 104539.

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104539>

Parsa, R., Yang, A., McKeon, F., & Green, H. (1999). Association of p63 with Proliferative Potential in Normal and Neoplastic Human Keratinocytes. *Journal of*

*Investigative Dermatology*, 113(6), 1099-1105. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00780.x>

Patel, V., Martin, D., Malhotra, R., Marsh, C. A., Doçi, C. L., Veenstra, T. D., Nathan, C.-A.

O., Sinha, U. K., Singh, B., Molinolo, A. A., Rusling, J. F., & Gutkind, J. S. (2013).

DSG3 as a biomarker for the ultrasensitive detection of occult lymph node metastasis in oral cancer using nanostructured immunoarrays. *Oral Oncology*, 49(2), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.08.001>

Pekny, M., & Lane, E. B. (2007). Intermediate filaments and stress. *Experimental Cell*

*Research*, 313(10), 2244-2254. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.023>

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin,

D., McKeon, F., & De Luca, M. (2001). P63 identifies keratinocyte stem cells.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3156-3161.

<https://doi.org/10.1073/pnas.061032098>

Pelosi, G., Fabbri, A., Bianchi, F., Maisonneuve, P., Rossi, G., Barbareschi, M., Graziano,

P., Cavazza, A., Rekhman, N., Pastorino, U., Scanagatta, P., & Papotti, M. (2012).

ΔNp63 (p40) and Thyroid Transcription Factor-1 Immunoreactivity on Small Biopsies or Cellblocks for Typing Non-small Cell Lung Cancer: A Novel Two-Hit, Sparing-Material Approach. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(2), 281-290.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823815d3>

Perez, C. A., Ott, J., Mays, D. J., & Pietenpol, J. A. (2007). p63 consensus DNA-binding

site: Identification, analysis and application into a p63MH algorithm. *Oncogene*,

26(52), 7363-7370. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210561>

- Pesch, B., Kendzia, B., Gustavsson, P., Jöckel, K.-H., Johnen, G., Pohlabein, H., Olsson, A., Ahrens, W., Gross, I. M., Brüske, I., Wichmann, H.-E., Merletti, F., Richiardi, L., Simonato, L., Fortes, C., Siemiatycki, J., Parent, M.-E., Consonni, D., Landi, M. T., ... Brüning, T. (2012). Cigarette smoking and lung cancer-relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *International Journal of Cancer*, *131*(5), 1210-1219.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.27339>
- Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S. H., Chan, G., & O'Shea, J. J. (2008). Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunological Reviews*, *223*(1), 132-142.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00644.x>
- Phelps, C. A., Lai, S.-C., & Mu, D. (2018). Roles of Thyroid Transcription Factor 1 in Lung Cancer Biology. En *Vitamins and Hormones* (Vol. 106, pp. 517-544). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.05.007>
- Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E. F., Faivre-Finn, C., Mok, T. S., Reck, M., Van Schil, P. E., Hellmann, M. D., & Peters, S. (2019). Correction to: «Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *30*(5), 863-870.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy474>
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*, *112*(4), 453-465.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X)
- Puglisi, F., Barbone, F., Damante, G., Bruckbauer, M., Di Lauro, V., Beltrami, C. A., & Di Loreto, C. (1999). Prognostic value of thyroid transcription factor-1 in primary, resected, non-small cell lung carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *12*(3), 318-324.

- Puglisi, F., Cesselli, D., Damante, G., Pellizzari, L., Beltrami, C. A., & Di Loreto, C. (2000). Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant thyroid diseases. *Anticancer Research*, 20(1A), 311-316.
- Puig, P., Capodiceci, P., Drobnjak, M., Verbel, D., Prives, C., Cordon-Cardo, C., & Di Como, C. J. (2003). p73 Expression in human normal and tumor tissues: Loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(15), 5642-5651.
- Qian, L., Xu, F., Wang, X., Jiang, M., Wang, J., Song, W., Wu, D., Shen, Z., Feng, D., Ling, B., Cheng, Y., Xiao, W., Shan, G., & Zhou, Y. (2017). LncRNA expression profile of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in cervical squamous cancers and its suppressive effects on LIF expression. *Cytokine*, 96, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.001>
- Ramalingam, S., & Belani, C. (2008). Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions. *The Oncologist*, 13(S1), 5-13. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.13-S1-5>
- Rami-Porta, R., Bolejack, V., Giroux, D. J., Chansky, K., Crowley, J., Asamura, H., & Goldstraw, P. (2014). The IASLC Lung Cancer Staging Project: The New Database to Inform the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(11), 1618-1624. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000334>
- Ratovitski, E. A., Patturajan, M., Hibi, K., Trink, B., Yamaguchi, K., & Sidransky, D. (2001). P53 associates with and targets  $\Delta$ Np63 into a protein degradation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1817-1822. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1817>
- Ready, N., Farago, A. F., de Braud, F., Atmaca, A., Hellmann, M. D., Schneider, J. G., Spigel, D. R., Moreno, V., Chau, I., Hann, C. L., Eder, J. P., Steele, N. L., Pieters, A.,

- Fairchild, J., & Antonia, S. J. (2019). Third-Line Nivolumab Monotherapy in Recurrent SCLC: CheckMate 032. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(2), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.10.003>
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Rangwala, R., Brahmer, J. R., & KEYNOTE-024 Investigators. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *375*(19), 1823-1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
- Rekhtman, N., Ang, D. C., Sima, C. S., Travis, W. D., & Moreira, A. L. (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology*, *24*(10), 1348-1359. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92>
- Rhee, D., Wenig, B. M., & Smith, R. V. (2002). The Significance of Immunohistochemically Demonstrated Nodal Micrometastases in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: *The Laryngoscope*, *112*(11), 1970-1974. <https://doi.org/10.1097/00005537-200211000-00011>
- Rietscher, K., Wolf, A., Hause, G., Rother, A., Keil, R., Magin, T. M., Glass, M., Niessen, C. M., & Hatzfeld, M. (2016). Growth Retardation, Loss of Desmosomal Adhesion, and Impaired Tight Junction Function Identify a Unique Role of Plakophilin 1 In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(7), 1471-1478. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.021>
- Ring, B. Z., Seitz, R. S., Beck, R. A., Shasteen, W. J., Soltermann, A., Arbogast, S., Robert, F., Schreeder, M. T., & Ross, D. T. (2009). A novel five-antibody

- immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Modern Pathology*, 22(8), 1032-1043. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.60>
- Roden, A. C., García, J. J., Wehrs, R. N., Colby, T. V., Khoor, A., Leslie, K. O., & Chen, L. (2014). Histopathologic, immunophenotypic and cytogenetic features of pulmonary mucoepidermoid carcinoma. *Modern Pathology*, 27(11), 1479-1488. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.72>
- Rogers, M. A., Winter, H., Langbein, L., Bleiler, R., & Schweizer, J. (2004). The human type I keratin gene family: Characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. *Differentiation*, 72(9-10), 527-540. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07209006.x>
- Rogers, M. A., Winter, H., Schweizer, J., Langbein, L., & Praetzel, S. (2003). K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 Represent the Inner-Root-Sheath-Specific Type II Epithelial Keratins of the Human Hair Follicle1. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(4), 512-522. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12087.x>
- Romano, R.-A., Ortt, K., Birkaya, B., Smalley, K., & Sinha, S. (2009). An Active Role of the  $\Delta N$  Isoform of p63 in Regulating Basal Keratin Genes K5 and K14 and Directing Epidermal Cell Fate. *PLoS ONE*, 4(5), e5623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005623>
- Romano, R.-A., Smalley, K., Magraw, C., Serna, V. A., Kurita, T., Raghavan, S., & Sinha, S. (2012).  $\Delta Np63$  knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development*, 139(4), 772-782. <https://doi.org/10.1242/dev.071191>
- Roscoe, R. J., Deddens, J. A., Salvan, A., & Schnorr, T. M. (1995). Mortality among Navajo uranium miners. *American Journal of Public Health*, 85(4), 535-540. <https://doi.org/10.2105/AJPH.85.4.535>

- Rotow, J., & Bivona, T. G. (2017). Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nature Reviews Cancer*, 17(11), 637-658. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.84>
- Russo, A. E., Priolo, D., Antonelli, G., Libra, M., Mccubrey, J. A., & Ferraù, F. (2017). Bevacizumab in the treatment of NSCLC: Patient selection and perspectives. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, Volume 8, 259-269. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S110306>
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(1), 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.002>
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 133-142. <https://doi.org/10.1038/nrc725>
- Saladi, S. V., Ross, K., Karaayvaz, M., Tata, P. R., Mou, H., Rajagopal, J., Ramaswamy, S., & Ellisen, L. W. (2017). ACTL6A Is Co-Amplified with p63 in Squamous Cell Carcinoma to Drive YAP Activation, Regenerative Proliferation, and Poor Prognosis. *Cancer Cell*, 31(1), 35-49. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.12.001>
- Sanchez-Palencia, A., Gomez-Morales, M., Gomez-Capilla, J. A., Pedraza, V., Boyero, L., Rosell, R., & Fárez-Vidal, M. E. (2011a). Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 129(2), 355-364. <https://doi.org/10.1002/ijc.25704>
- Sanchez-Palencia, A., Gomez-Morales, M., Gomez-Capilla, J. A., Pedraza, V., Boyero, L., Rosell, R., & Fárez-Vidal, M. E. (2011b). Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 129(2), 355-364. <https://doi.org/10.1002/ijc.25704>
- Savci-Heijink, C. D., Kosari, F., Aubry, M.-C., Caron, B. L., Sun, Z., Yang, P., & Vasmataz, G. (2009). The role of desmoglein-3 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of

the lung. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1629-1637.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080778>

Schilsky, J. B., Ni, A., Ahn, L., Datta, S., Travis, W. D., Kris, M. G., Chaft, J. E., Rekhtman, N., & Hellmann, M. D. (2017). Prognostic impact of TTF-1 expression in patients with stage IV lung adenocarcinomas. *Lung Cancer*, 108, 205-211.

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.03.015>

Schmidt, A., & Jäger, S. (2005). Plakophilins—Hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3), 189-204.

<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.020>

Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R., & Franke, W. W. (1997).

Plakophilins 1a and 1b: Widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and Tissue Research*, 290(3), 481-499. <https://doi.org/10.1007/s004410050956>

Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

Schubauer-Berigan, M. K., Daniels, R. D., & Pinkerton, L. E. (2009). Radon Exposure and Mortality Among White and American Indian Uranium Miners: An Update of the Colorado Plateau Cohort. *American Journal of Epidemiology*, 169(6), 718-730.

<https://doi.org/10.1093/aje/kwn406>

Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy.

*Science*, 348(6230), 69-74. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4971>

Schuppert, F., Reiser, M., & zur Mühlen, A. von. (2009). TSH-Receptor and Adhesion

Molecules in Autoimmune Thyroid Disease. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 100(04/05), 28-31. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211170>

- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A. D., Rogers, M. A., & Wright, M. W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*, 174(2), 169-174. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603161>
- Schweizer, J., Langbein, L., Rogers, M. A., & Winter, H. (2007). Hair follicle-specific keratins and their diseases. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2010-2020. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.032>
- Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P., & McKeon, F. (2007). p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell*, 129(3), 523-536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.045>
- Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cosper, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S., Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., ... Engelman, J. A. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine*, 3(75). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>
- Serber, Z., Lai, H. C., Yang, A., Ou, H. D., Sigal, M. S., Kelly, A. E., Darimont, B. D., Duijf, P. H. G., van Bokhoven, H., McKeon, F., & Dötsch, V. (2002). A C-Terminal Inhibitory Domain Controls the Activity of p63 by an Intramolecular Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 22(24), 8601-8611. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.24.8601-8611.2002>
- Shalapour, S., & Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3347-3355. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>
- Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S. R., Costa, D. B., Heist, R. S., Solomon, B., Stubbs, H., Admane, S., McDermott, U., Settleman, J., Kobayashi,

- S., Mark, E. J., Rodig, S. J., Chirieac, L. R., Kwak, E. L., Lynch, T. J., & Iafrate, A. J. (2009). Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Who Harbor *EML4-ALK*. *Journal of Clinical Oncology*, 27(26), 4247-4253. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993>
- Shay, J. W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discovery*, 6(6), 584-593. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>
- Shetty, V. B., Kiraly-Borri, C., Lamont, P., Bikker, H., & Choong, C. S. Y. (2014). NKX2-1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: A case series of four patients. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(3-4). <https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0109>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Sigel, K., Wisnivesky, J., Gordon, K., Dubrow, R., Justice, A., Brown, S. T., Goulet, J., Butt, A. A., Crystal, S., Rimland, D., Rodriguez-Barradas, M., Gibert, C., Park, L. S., & Crothers, K. (2012). HIV as an independent risk factor for incident lung cancer. *AIDS*, 26(8), 1017-1025. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328352d1ad>
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P., Thakkannavar, S., & Pujari, V. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18(3), 121. [https://doi.org/10.4103/aam.aam\\_56\\_18](https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18)
- Sobolik-Delmaire, T., Reddy, R., Pashaj, A., Roberts, B. J., & Wahl, J. K. (2010). Plakophilin-1 Localizes to the Nucleus and Interacts with Single-Stranded DNA. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(11), 2638-2646. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.191>
- Solassol, J., Burcia, V., Costes, V., Lacombe, J., Mange, A., Barbotte, E., de Verbizier, D., Cartier, C., Makeieff, M., Crampette, L., Boulle, N., Maudelonde, T., Guerrier, B., & Garrel, R. (2010). Pemphigus vulgaris antigen mRNA quantification for the

- staging of sentinel lymph nodes in head and neck cancer. *British Journal of Cancer*, 102(1), 181-187. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605470>
- Spindler, V., & Waschke, J. (2018). Pemphigus—A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9, 136. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00136>
- Sprecher, E., Molho-Pessach, V., Ingber, A., Sagi, E., Indelman, M., & Bergman, R. (2004). Homozygous Splice Site Mutations in PKP1 Result in Loss of Epidermal Plakophilin 1 Expression and Underlie Ectodermal Dysplasia/Skin Fragility Syndrome in Two Consanguineous Families. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(3), 647-651. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22335.x>
- Stahlman, M. T., Gray, M. E., & Whitsett, J. A. (1996). Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(7), 673-678. <https://doi.org/10.1177/44.7.8675988>
- Steinert, P. M., Idler, W. W., Zhou, X.-M., Johnson, L. D., Parry, D. A. D., Steven, A. C., & Roop, D. R. (1985). Structural and Functional Implications of Amino Acid Sequences of Keratin Intermediate Filament Subunits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 455(1 Intermediate), 451-461. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb50428.x>
- Stewart, B. W., Wild, C., International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization (Eds.). (2014). *World cancer report 2014*. International Agency for Research on Cancer.
- Stoll, L. M., Johnson, M. W., Gabrielson, E., Askin, F., Clark, D. P., & Li, Q. K. (2010). The utility of Napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. *Cancer Cytopathology*, 118(6), 441-449. <https://doi.org/10.1002/cncy.20108>

- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M. G., Monti, O., Baccharini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., & Blandino, G. (2002). Physical Interaction with Human Tumor-derived p53 Mutants Inhibits p63 Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18817-18826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201405200>
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Cristofanelli, B., Shaul, Y., Castagnoli, L., Levine, A. J., Sacchi, A., Cesareni, G., Oren, M., & Blandino, G. (2000). Physical and Functional Interaction between p53 Mutants and Different Isoforms of p73. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29503-29512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003360200>
- Subramanian, J., & Govindan, R. (2007). Lung Cancer in Never Smokers: A Review. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 561-570. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.8015>
- Sun, T.-T., Shih, C., & Green, H. (1979). Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6), 2813-2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.6.2813>
- Suzuki, A., Shijubo, N., Yamada, G., Ichimiya, S., Satoh, M., Abe, S., & Sato, N. (2005). Napsin A is useful to distinguish primary lung adenocarcinoma from adenocarcinomas of other organs. *Pathology - Research and Practice*, 201(8-9), 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2005.05.010>
- Swensson, Langbein, Mcmillan, Stevens, Leigh, Mclean, Lane, & Eady. (1998). Specialized keratin expression pattern in human ridged skin as an adaptation to high physical stress. *British Journal of Dermatology*, 139(5), 767-775. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02499.x>
- Tacha D, Yu CH, Haas T. (2011a). TTF-1, Napsin A, p63, TRIM29, Desmoglein 3 and CK5: An evaluation of sensitivity and specificity and correlation of tumor grade for lung cell carcinoma vs. Lung adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 24, 425A.

- Tacha D, Yu CH, Haas T. (2011b). TTF-1, Napsin A, p63, TRIM29, Desmoglein 3 and CK5: An evaluation of sensitivity and specificity and correlation of tumor grade for lung cell carcinoma vs. Lung adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 24, 425A.
- Tacha D, Zhou D, Henshall-Powell RL. (2010a). Distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in lung using double stains p63+ CK5 and TTF-1+Napsin A. *Modern Pathology*, 23, 222A.
- Tacha D, Zhou D, Henshall-Powell RL. (2010b). Distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in lung using double stains p63+ CK5 and TTF-1+Napsin A. *Modern Pathology*, 23, 222A.
- Tai, G., Ranjzad, P., Marriage, F., Rehman, S., Denley, H., Dixon, J., Mitchell, K., Day, P. J. R., & Woolf, A. S. (2013). Cytokeratin 15 Marks Basal Epithelia in Developing Ureters and Is Upregulated in a Subset of Urothelial Cell Carcinomas. *PLoS ONE*, 8(11), e81167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081167>
- Takahashi, K., Coulombe, P. A., & Miyachi, Y. (1999). Using transgenic models to study the pathogenesis of keratin-based inherited skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 21(2), 73-95. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(99\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(99)00023-7)
- Takes, R. P. (2004). Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: Imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncology*, 40(7), 656-667. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2003.11.001>
- Takeuchi, A., Oguri, T., Yamashita, Y., Sone, K., Fukuda, S., Takakuwa, O., Uemura, T., Maeno, K., Inoue, Y., Yamamoto, S., Nishiyama, H., Fukumitsu, K., Kanemitsu, Y., Tajiri, T., Ohkubo, H., Takemura, M., Ito, Y., & Niimi, A. (2020). Value of TTF-1 expression in non-squamous non-small-cell lung cancer for assessing docetaxel monotherapy after chemotherapy failure. *Molecular and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3892/mco.2020.2080>

- Tanaka, H., Yanagisawa, K., Shinjo, K., Taguchi, A., Maeno, K., Tomida, S., Shimada, Y., Osada, H., Kosaka, T., Matsubara, H., Mitsudomi, T., Sekido, Y., Tanimoto, M., Yatabe, Y., & Takahashi, T. (2007). Lineage-Specific Dependency of Lung Adenocarcinomas on the Lung Development Regulator TTF-1. *Cancer Research*, 67(13), 6007-6011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4774>
- Tanaka, Y., Kameoka, M., Itaya, A., Ota, K., & Yoshihara, K. (2004). Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73 $\alpha$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(3), 865-872. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.124>
- Tatnell, P. J., Powell, D. J., Hill, J., Smith, T. S., Tew, D. G., & Kay, J. (1998). Napsins: New human aspartic proteinases: Distinction between two closely related genes. *FEBS Letters*, 441(1), 43-48. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01522-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01522-1)
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363-374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Teh, M.-T., Ken Parkinson, E., Thurlow, J. K., Liu, F., Fortune, F., & Wan, H. (2011). A molecular study of desmosomes identifies a desmoglein isoform switch in head and neck squamous cell carcinoma: Molecular study of desmosomes identifies. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(1), 67-76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00951.x>
- Tell, G., Pines, A., Paron, I., D'Elia, A., Bisca, A., Kelley, M. R., Manzini, G., & Damante, G. (2002). Redox Effector Factor-1 Regulates the Activity of Thyroid Transcription Factor 1 by Controlling the Redox State of the N Transcriptional Activation Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14564-14574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200582200>

Terry, J., Leung, S., Laskin, J., Leslie, K. O., Gown, A. M., & Ionescu, D. N. (2010a). Optimal Immunohistochemical Markers For Distinguishing Lung Adenocarcinomas From Squamous Cell Carcinomas in Small Tumor Samples. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(12), 1805-1811.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181f7dae3>

Terry, J., Leung, S., Laskin, J., Leslie, K. O., Gown, A. M., & Ionescu, D. N. (2010b). Optimal Immunohistochemical Markers For Distinguishing Lung Adenocarcinomas From Squamous Cell Carcinomas in Small Tumor Samples. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(12), 1805-1811.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181f7dae3>

Testoni, B., Borrelli, S., Tenedini, E., Alotto, D., Castagnoli, C., Piccolo, S., Tagliafico, E., Ferrari, S., Viganò, M. A., & Mantovani, R. (2006). Identification of New p63 Targets in Human Keratinocytes. *Cell Cycle*, 5(23), 2805-2811.

<https://doi.org/10.4161/cc.5.23.3525>

Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535-554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)

Thanos, C. D., & Bowie, J. U. (1999). P53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Science*, 8(8), 1708-1710.

<https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1708>

Thekdi, A. A., & Ferris, R. L. (2002). Diagnostic assessment of laryngeal cancer.

*Otolaryngologic Clinics of North America*, 35(5), 953-969.

[https://doi.org/10.1016/S0030-6665\(02\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0030-6665(02)00041-5)

Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S., & Garrod, D. R. (2010). Desmosomes: Adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 429(3), 419-433. <https://doi.org/10.1042/BJ20100567>

- Torre, L. A., Siegel, R. L., & Jemal, A. (2016). Lung Cancer Statistics. En A. Ahmad & S. Gadgeel (Eds.), *Lung Cancer and Personalized Medicine* (Vol. 893, pp. 1-19). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1)
- Toyooka, S., Tokumo, M., Shigematsu, H., Matsuo, K., Asano, H., Tomii, K., Ichihara, S., Suzuki, M., Aoe, M., Date, H., Gazdar, A. F., & Shimizu, N. (2006). Mutational and Epigenetic Evidence for Independent Pathways for Lung Adenocarcinomas Arising in Smokers and Never Smokers. *Cancer Research*, *66*(3), 1371-1375. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2625>
- Travis, W. D., Asamura, H., Bankier, A. A., Beasley, M. B., Detterbeck, F., Flieder, D. B., Goo, J. M., MacMahon, H., Naidich, D., Nicholson, A. G., Powell, C. A., Prokop, M., Rami-Porta, R., Rusch, V., van Schil, P., Yatabe, Y., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., ... Blackstone, E. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *11*(8), 1204-1223. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.03.025>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1240-1242. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000663>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, Lucian. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1243-1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, P. E., Garg, K., Austin, J. H. M., Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., ... Yankelewitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244-285.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D. B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P. S., Henderson, D. W., Kerr, K. M., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E., & Tsao, M. (2013). Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(5), 668-684.

<https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0263-RA>

Trivedi, S., Mattos, J., Gooding, W., Godfrey, T. E., & Ferris, R. L. (2013). Correlation of Tumor Marker Expression with Nodal Disease Burden in Metastatic Head and Neck Cancer. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 149(2), 261-268.

<https://doi.org/10.1177/0194599813486876>

Tsimberidou, A.-M. (2015). Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(6), 1113-1132. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2861-1>

Ueno, T., Linder, S., & ElMBERGER, G. (2003). Aspartic proteinase Napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, 88(8), 1229-1233. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600879>

- Ueno, T., Linder, S., Na, C.-L., Rice, W. R., Johansson, J., & Weaver, T. E. (2004). Processing of Pulmonary Surfactant Protein B by Napsin and Cathepsin H. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16178-16184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312029200>
- Uitto, J., Richard, G., & McGrath, J. A. (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental Cell Research*, 313(10), 1995-2009. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.029>
- van Bodegraven, E. J., & Etienne-Manneville, S. (2021). Intermediate Filaments from Tissue Integrity to Single Molecule Mechanics. *Cells*, 10(8), 1905. <https://doi.org/10.3390/cells10081905>
- Vikhreva, P., Melino, G., & Amelio, I. (2018). p73 Alternative Splicing: Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms. *Journal of Molecular Biology*, 430(13), 1829-1838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.034>
- Villar Álvarez, F., Muguruza Trueba, I., Belda Sanchis, J., Molins López-Rodó, L., Rodríguez Suárez, P. M., Sánchez de Cos Escuín, J., Barreiro, E., Borrego Pintado, M. H., Disdier Vicente, C., Flandes Aldeyturriaga, J., Gámez García, P., Garrido López, P., León Atance, P., Izquierdo Elena, J. M., Novoa Valentín, N. M., Rivas de Andrés, J. J., Royo Crespo, Í., Salvatierra Velázquez, Á., Seijo Maceiras, L. M., ... Zulueta, J. J. (2016). Sumario ejecutivo de las recomendaciones SEPAR de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Archivos de Bronconeumología*, 52(7), 378-388. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.02.016>
- Visconti, R., Morra, F., Guggino, G., & Celetti, A. (2017). The between Now and Then of Lung Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1374. <https://doi.org/10.3390/ijms18071374>

- Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T. P., & Garrod, D. (2000). The  $\alpha$  Isoform of Protein Kinase C Is Involved in Signaling the Response of Desmosomes to Wounding in Cultured Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 1077-1092. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.1077>
- Wang, L., Liu, T., Wang, Y., Cao, L., Nishioka, M., Aguirre, R. L., Ishikawa, A., Geng, L., & Okada, N. (2007). Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and  $\beta$ -catenin in oral squamous cell carcinoma: Correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Archiv*, 451(5), 959-966. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0485-5>
- Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Watanabe, H., Francis, J. M., Woo, M. S., Etemad, B., Lin, W., Fries, D. F., Peng, S., Snyder, E. L., Tata, P. R., Izzo, F., Schinzel, A. C., Cho, J., Hammerman, P. S., Verhaak, R. G., Hahn, W. C., Rajagopal, J., Jacks, T., & Meyerson, M. (2013). Integrated genomic and expression analysis of amplified *NKX2-1* in lung adenocarcinoma identifies *LMO3* as a functional transcriptional target. *Genes & Development*, 27(2), 197-210. <https://doi.org/10.1101/gad.203208.112>
- Weidemann, S., Böhle, J. L., Contreras, H., Luebke, A. M., Kluth, M., Büscheck, F., Hübner, M., Magg, C., Höflmayer, D., Möller, K., Fraune, C., Bernreuther, C., Rink, M., Simon, R., Menz, A., Hinsch, A., Lebok, P., Clauditz, T., Sauter, G., Uhlig, R., ... Minner, S. (2021). Napsin A Expression in Human Tumors and Normal Tissues. *Pathology and Oncology Research*, 27, 613099. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.613099>
- Weir, B. A., Woo, M. S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., Beroukhi, R., Lin, W. M., Province, M. A., Kraja, A., Johnson, L. A., Shah, K., Sato, M., Thomas, R. K., Barletta, J. A., Borecki, I. B., Broderick, S., Chang, A. C., Chiang, D. Y., Chirieac, L. R., ...

- Meyerson, M. (2007). Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, *450*(7171), 893-898.  
<https://doi.org/10.1038/nature06358>
- Wolf, A., & Hatzfeld, M. (2010). A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle*, *9*(15), 3045-3050. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12446>
- Wolf, A., Krause-Gruszczynska, M., Birkenmeier, O., Ostareck-Lederer, A., Hüttelmaier, S., & Hatzfeld, M. (2010). Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *Journal of Cell Biology*, *188*(4), 463-471.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200908135>
- Wolf, A., Rietscher, K., Glaß, M., Hüttelmaier, S., Schutkowski, M., Ihling, C., Sinz, A., Wingenfeld, A., Mun, A., & Hatzfeld, M. (2013). Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 functions from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *Journal of Cell Science*, *jcs.118992*.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.118992>
- Wright, J. T., Fete, M., Schneider, H., Zinser, M., Koster, M. I., Clarke, A. J., Hadj-Rabia, S., Tadini, G., Pagnan, N., Visinoni, A. F., Bergendal, B., Abbott, B., Fete, T., Stanford, C., Butcher, C., D'Souza, R. N., Sybert, V. P., & Morasso, M. I. (2019). Ectodermal dysplasias: Classification and organization by phenotype, genotype and molecular pathway. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *179*(3), 442-447. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61045>
- Wynder, E. L. (1950). TOBACCO SMOKING AS A POSSIBLE ETIOLOGIC FACTOR IN BRONCHIOGENIC CARCINOMA: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. *Journal of the American Medical Association*, *143*(4), 329.  
<https://doi.org/10.1001/jama.1950.02910390001001>

- Xia, A.-L., He, Q.-F., Wang, J.-C., Zhu, J., Sha, Y.-Q., Sun, B., & Lu, X.-J. (2019). Applications and advances of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy. *Journal of Medical Genetics*, 56(1), 4-9. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105422>
- Xin, Z., Yamaguchi, A., & Sakamoto, K. (2014). Aberrant expression and altered cellular localization of desmosomal and hemidesmosomal proteins are associated with aggressive clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv*, 465(1), 35-47. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1594-6>
- Yamaoka, T., Ohba, M., & Ohmori, T. (2017). Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2420. <https://doi.org/10.3390/ijms18112420>
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dötsch, V., Andrews, N. C., Caput, D., & McKeon, F. (1998). P63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell*, 2(3), 305-316. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80275-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80275-0)
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., & McKeon, F. (1999). P63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398(6729), 714-718. <https://doi.org/10.1038/19539>
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., & Caput, D. (2000). P73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404(6773), 99-103. <https://doi.org/10.1038/35003607>

- Yang, A., Zhu, Z., Kettenbach, A., Kapranov, P., McKeon, F., Gingeras, T. R., & Struhl, K. (2010). Genome-Wide Mapping Indicates That p73 and p63 Co-Occupy Target Sites and Have Similar DNA-Binding Profiles In Vivo. *PLoS ONE*, *5*(7), e11572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011572>
- Ye, J., Findeis-Hosey, J. J., Yang, Q., McMahon, L. A., Yao, J. L., Li, F., & Xu, H. (2011). Combination of Napsin A and TTF-1 Immunohistochemistry Helps in Differentiating Primary Lung Adenocarcinoma From Metastatic Carcinoma in the Lung. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *19*(4), 313-317. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318205b059>
- Yin, T., & Green, K. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *15*(6), 665-677. [https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(04\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S1084-9521(04)00091-6)
- Yin, Z., Gonzales, L., Kolla, V., Rath, N., Zhang, Y., Lu, M. M., Kimura, S., Ballard, P. L., Beers, M. F., Epstein, J. A., & Morrisey, E. E. (2006). Hop functions downstream of Nkx2.1 and GATA6 to mediate HDAC-dependent negative regulation of pulmonary gene expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*(2), L191-L199. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00385.2005>
- Zhang, C., Liang, Y., Ma, M.-H., Wu, K.-Z., & Dai, D.-Q. (2019). KRT15, INHBA, MATN3, and AGT are aberrantly methylated and differentially expressed in gastric cancer and associated with prognosis. *Pathology - Research and Practice*, *215*(5), 893-899. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.034>
- Zhang, J., Yang, P. L., & Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, *9*(1), 28-39. <https://doi.org/10.1038/nrc2559>
- Zhang, P., Zuo, H., Nakamura, Y., Nakamura, M., Wakasa, T., & Kakudo, K. (2006). Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid

tumors. *Pathology International*, 56(5), 240-245.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01959.x>

Zhou, B., Zhong, Q., Minoo, P., Li, C., Ann, D. K., Frenkel, B., Morrissey, E. E., Crandall, E.

D., & Borok, Z. (2008). Foxp2 Inhibits Nkx2.1-Mediated Transcription of SP-C via

Interactions with the Nkx2.1 Homeodomain. *American Journal of Respiratory*

*Cell and Molecular Biology*, 38(6), 750-758. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007->

03500C

Zhou, G., Yang, L., Gray, A., Srivastava, A. K., Li, C., Zhang, G., & Cui, T. (2017). The role of

desmosomes in carcinogenesis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10, 4059-

4063. <https://doi.org/10.2147/OTT.S136367>

Zhou, Q., & Xi, S. (2018). A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism,

genotoxicity and epigenetic changes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*,

99, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.09.010>

**Comentario [MEFV1]:** Insertado con zotero

COPIA

**ANEXO**

**1**

