



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

**“LIPOCALINA ASOCIADA A GELATINASA DE NEUTRÓFILOS (NGAL) Y
METALOPROTEINASA DE MATRIZ – 9 (MMP-9) COMO FACTORES
PRONÓSTICOS EN ADENOCARCINOMA DE PULMÓN.”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

DR. JOSÉ MANUEL RUIZ MORALES

ASESOR DE TESIS:

DR. DANIEL MOTOLA KUBA

ONCOLOGÍA MÉDICA
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Alberto Lifshitz Guinzberg
Director Académico
Fundación Clínica Médica Sur

Dr. Daniel Motola Kuba
Profesor Titular del Curso de Especialización en
Oncología Médica
Fundación Clínica Médica Sur

Dr. Daniel Motola Kuba
Asesor de Tesis
Oncología Médica
Fundación Clínica Médica Sur

INDICE

I.	Introducción	6
II.	Marco Teórico	6
	Epidemiología	6
	Factores de riesgo	6
	Biología del cáncer de pulmón	7
	Presentación clínicas y diagnóstico	9
	Clasificación	10
	Pronóstico	10
	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL)	11
	Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9)	11
III.	Planteamiento del problema y justificación	14
IV.	Resultados	17
V.	Discusión	19
VI.	Conclusión	21
VII.	Tablas y figuras	22

A mi Familia.

Introducción

El cáncer de pulmón es un problema de salud pública a nivel mundial ya que es la primera causa de mortalidad por cáncer. El término “cáncer de pulmón” (antes llamado carcinoma broncogénico) engloba todas las neoplasias malignas que se originan en las vías respiratorias inferiores y parénquima pulmonar. Del 95% de los casos, 15% corresponden a cáncer de células pequeñas (CPCP) y 80% a células no pequeñas (CPCNP). Esta determinación cobra demasiada importancia ya que el pronóstico y tratamiento es muy diferente entre ambos grupos.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en el mundo, tanto en mujeres como en hombres. En el 2012 presentó una incidencia a nivel mundial de 1.8 millones de casos nuevos, provocando 1.6 millones de muertes.(1) En México, de acuerdo con GLOBOCAN 2012, esta enfermedad tuvo una incidencia de 8,439 casos, por debajo de cáncer mama y cérvix uterino en mujeres y de próstata en hombres, y discretamente por debajo de cáncer colo – rectal. Pero en mortalidad, se mantuvo como la principal causa en ambos sexos con 7,608 defunciones (9.7% del total de mortalidad por cáncer) en el país. Lamentablemente a cinco años, sólo el 16.6% de los Pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón estarán vivos, independientemente del estadio al diagnóstico.(2)

Factores de riesgo

Existen factores de riesgo modificables (ambientales) y no modificables (genéticos) que juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de pulmón. El principal factor de riesgo es el tabaquismo, identificado desde hace años como un factor causal directo de este tipo de cáncer en el 90% de los casos.(3) El humo del tabaco contiene varios químicos carcinógenos como nitrosaminas y epóxido de benzopireno. El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón aumenta conforme al índice tabáquico (IT). De forma general se sabe que el riesgo es veinte veces mayor en un fumador de una cajetilla al día durante cuarenta años comparado con alguien que nunca ha fumado. En una serie mexicana, los fumadores aumentaron su riesgo diez veces más que la población no fumadora, de desarrollar cáncer de pulmón primario a partir de un IT de 10. (4) Así también el tabaquismo pasivo confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar (RR 1.05 a 1.24, dependiendo de la serie).(5, 6)

Existen factores genéticos que aumentan el riesgo y modifican el pronóstico del cáncer pulmonar. Algunos estudios han encontrado que el riesgo relativo de cáncer pulmonar relacionado únicamente al antecedente familiar en primer grado, ajustado a edad, género, residencia, educación y tabaquismo es de 1.57.(7) Otros

estudios han sugerido *loci* susceptibles para cáncer de pulmón que incluyen cromosomas 6q, 5p15.33, 13q31.3, 15q25 y 6p21.(8-10) También se han demostrado polimorfismos en las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 del citocromo p450, así como polimorfismos en los genes de reparación MLH1 y MSH2 y glutatión-S-transferasas.(11, 12) Algunas mutaciones específicas se han identificado en un número limitado de familias no fumadoras con altas tasas de CPCNP. La mejor estudiada son las mutaciones germinales en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).(13)

Otros factores de riesgo identificados son la exposición al gas radón, asbesto (principalmente en fumadores), inflamación pulmonar crónica, fibrosis pulmonar, tuberculosis, exposición a éter, hidrocarburos aromáticos poli – cíclicos, cromo, níquel, cadmio, berilio, sílice y humo de diésel.(14-18)

La radioterapia (Rt) puede incrementar el riesgo, en pacientes que han recibido esta modalidad de tratamiento para otras neoplasias, de un segundo primario de cáncer de pulmón. Este riesgo está bien identificado en Pacientes con antecedente de linfoma de Hodgkin(19) y cáncer de mama.(20) El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) incrementa el riesgo de cáncer de pulmón comparado con los controles no infectados.(21)

Los estudios epidemiológicos no han logrado demostrar que alguna intervención dietética (antioxidantes, vegetales verdes o fitoestrógenos) disminuya la incidencia de cáncer de pulmón en individuos con riesgo elevado. Incluso, en el estudio de prevención con alfa - tocoferol y beta - caroteno, demostró por el contrario un incremento de cáncer de pulmón entre los fumadores que eran suplementados dietéticamente con beta-caroteno.(22)

Biología del cáncer de pulmón

Se desconocen en la mayoría de los casos, los eventos específicos que promueven la transformación maligna de las células del epitelio bronquial. Previamente se discutieron las variaciones genéticas (componente intrínseco) y los carcinógenos ambientales (componente extrínseco) que contribuyen al desarrollo del cáncer de pulmón.(23) El conjunto de ambos provocan eventos moleculares que conllevan a la ganancia o pérdida de funciones y por ende a la des – regulación de vías genéticas involucradas en la proliferación, diferenciación, apoptosis, migración, invasión y otros procesos característicos de las células malignas. Existen diversas alteraciones moleculares adquiridas conocidas en los pacientes con cáncer de pulmón. **(Tabla 1).**(24)

El papel del tabaco en la génesis del cáncer pulmonar está bien descrito, ya que su metabolito tóxico, el diol epóxido está involucrado en las mutaciones del gen TP53.(25) Uno de los efectos carcinógenos del humo del tabaco es debido a la formación de aductos de ADN, que provoca errores en la replicación del ADN y las mutaciones subsecuentes. El dejar de fumar por lo menos cinco años disminuye los niveles de aductos en el tejido bronquial a niveles similar a los no

fumadores.(26)

De la anomalías genéticas adquiridas clínicamente más importantes, son la mutación en EGFR y la fusión de la cinasa de linfoma anaplásico (ALK).(27) De forma general, ambas mutaciones se consideran excluyente una de la otra. La mayoría de pacientes con estas mutaciones son menores de 67 años, no fumadores o fumadores ligeros (IT <10), histología adenocarcinoma y de origen asiático (30 – 70% vs. 17% en países occidentales).(28)

Las mutaciones en el gen de EGFR ocurren en occidente en un 17% de los pacientes con cáncer de pulmón y consisten en deleciones de aminoácidos en el exón 19 (LREA) y mutaciones puntuales en el exón 20 (L858R), lo que provoca una señalización constitutiva y activación de AKT promocionando de esta manera la proliferación celular independiente de la estimulación de ligandos.(29) Si los Pacientes tienen alguna mutación detectada en el EGFR, son candidatos en el contexto metastásico a terapia blanco con inhibidores de tirosina – cinasa (TKIs) del EGFR (actualmente aprobados erlotinib, gefitinib y afatinib) cuyas tasas de respuesta objetiva van del 43% al 90%.(30)

Las fusiones en ALK se encuentran del 7% de los pacientes con cáncer de pulmón. Existe actualmente en primera línea de tratamiento para estos Pacientes otro TKI: crizotinib. Este medicamento tiene respuestas objetivas de 66% (95% IC; 58 to 73). (31)

Las respuestas a los TKIs son de gran magnitud y persisten aún en Pacientes con varias líneas previas de tratamiento previo. Esto sugiere que los tumores desarrollan una “adicción” a éstas vías mutadas.(32) Lamentablemente la regla es la progresión de la enfermedad, secundario al desarrollo de mecanismos de resistencia por las células malignas. La mutación de resistencia más documentada es la substitución de treonina por metionina en la posición 790 en el exón 20 (T790M).(33)

La secuencia de cambios histológicos en el epitelio normal hacia células malignas es diferente para cada subtipo de cáncer de pulmón. Hay poca evidencia en cuanto los pasos de cada uno de ellos. Actualmente se sugiere que el carcinoma epidermoide se desarrolla a partir de metaplasia epidermoide y carcinoma *in situ*. Los adenocarcinomas provienen de lesiones hiperplásicas adenomatosas atípicas y los carcinomas de células pequeñas provienen de hiperplasia neuroendócrina. Actualmente existe un gran campo de investigación en esta área. Se conoce que 54% de los Pacientes con lesiones displásicas de alto grado desarrollaron cáncer en los siguientes dos años, pero curiosamente el 80% de los tumores se presentaron en lugares diferentes al sitio del carcinoma *in situ*.(34) Una hipótesis para explicar lo anterior, es que el potencial replicativo del cáncer de pulmón se encuentra en las células madre de pulmón, cuya biología es poco conocida. Las terapias actuales están dirigidas a la masa tumoral, y aún con respuestas patológicas completas, el fallo de los tratamientos es debido a que ninguna terapéutica actualmente está dirigida al potencial de división de las “células madre

cancerígenas”, lo cual promete ser el futuro del tratamiento.(35)

Presentación clínica y diagnóstico

Las manifestaciones clínicas del cáncer de pulmón dependerán del sitio del tumor primario, su diseminación intratorácica, de la presencia o no de metástasis y de síndromes paraneoplásicos asociados (osteoartropatía hipertrófica, hipercalcemia, síndrome de secreción inadecuada de hormona anti diurética [SIADH], Síndrome miasténico de Lambert – Eaton, encefalitis límbica, por mencionar algunos).(36) La mayoría de los Pacientes tienen antecedente de tabaquismo de varios años con síntomas secundarios al crecimiento tumoral intra – torácico (tos, disnea, disfonía) o a la enfermedad metastásica en casi un tercio de los Pacientes (síntomas del sistema nervioso central, dolor óseo).(37) Puede estar el cuadro acompañado de síntomas constitucionales como pérdida de peso, fatiga, anorexia y debilidad. No existe ningún síntoma o signo patognomónico de esta enfermedad y la posibilidad de un tumor maligno siempre debe de estar dentro del diagnóstico diferencial. Algunas series, con más de 3,500 Pacientes en total, han descrito las diferentes manifestaciones al momento del diagnóstico de Pacientes con cáncer de pulmón **(Tabla 2)**. (38, 39)

Es necesaria una evaluación integral por un grupo multi – disciplinario para el diagnóstico del cáncer de pulmón. Cualquier nódulo sospechoso pulmonar debe de someterse a biopsia o resección quirúrgica limitada (tru-cut guiado por TC o resección en cuña) incluso antes de una lobectomía. Todo caso debe de individualizarse, tomando en cuanto las comorbilidades del Paciente, la localización del tumor, la presencia o no de enfermedad mediastinal, metástasis y la experiencia del centro hospitalario. Para los nódulos sospechosos se puede realizar ultrasonido endobronquial (EBUS), broncoscopia navegacional o biopsia percutánea guiada por tomografía.(40)

Lo más importante durante el abordaje diagnóstico es poder identificar de forma adecuada a los Pacientes que se beneficiaran de un tratamiento definitivo (enfermedad local y localmente avanzada) y los que necesitaran un tratamiento paliativo (enfermedad metastásica).(41)

Además de una historia clínica detallada, son necesarios los estudios de imagen para poder determinar el estadio correcto de la enfermedad. Se recomienda realizar una tomografía computada (TC) contrastada de tórax, abdomen y pelvis para evaluar la extensión del tumor. Lamentablemente la TC no puede brindar información funcional o metabólica. Debido a lo anterior, el estudio de tomografía por emisión de positrones – TC (PET-CT) combina la modalidad de imagen de la TC junto con información metabólica tumoral; para enfermedad ganglionar mediastinal el PET-CT comparado con la TC sola tiene una sensibilidad (98 vs. 86%), especificidad (44 vs. 59%) y un valor predictivo negativo de 98%.(42) También tiene mayor poder para detectar metástasis ocultas extra torácicas que la TC sola (Sensibilidad 98%, especificidad 92%, valor predictivo positivo 89% y valor

predictivo negativo 98% para el PET – CT vs. 98, 18, 71 y 89% de la TC respectivamente). El Clínico debe tener en cuenta los diagnósticos diferenciales que deben considerarse en casos de falsos positivos (infecciones, procesos quirúrgicos recientes, etc.) y considerar la biopsia ante la duda de enfermedad metastásica.(43)

Actualmente el CPCNP se clasifica de acuerdo al sistema TNM de la AJCC 7ª edición. **(Tabla 3)**(44)

Clasificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los tumores primarios de pulmón en cuatro grandes grupos histológicos:(45)

1. Adenocarcinoma (38%)
2. Carcinoma epidermoide (20%)
3. Carcinoma de células grandes (5%)
4. Carcinoma de células pequeñas (13%)

También en la clasificación se incluyen: Otros carcinomas de células no pequeñas que no pueden ser clasificados (18%) y Otros (6%).

Desde 2011 la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) en conjunto con la Sociedad Americana de Tórax (ATS) y la Sociedad Europea Respiratoria (ERS) presentaron una clasificación Internacional para el adenocarcinoma de pulmón, esto con el objetivo de unificar terminologías y criterios diagnósticos, así como el manejo multidisciplinario y las técnicas de proceso del tejido. La clasificación es la siguiente:(46)

1. Lesiones pre invasoras

- Hiperplasia adenomatosa atípica
- Adenocarcinoma *in situ* (≤ 3 cm; antes llamado carcinoma bronquiolo alveolar)
- No mucinoso
- Mucinoso
- Mixto mucinoso / no mucinoso

2. Adenocarcinoma mínimamente invasor (≤ 3 cm. tumor predominantemente lepidico con invasión ≤ 5 mm.)

- No mucinoso
- Mucinoso
- Mixto mucinoso / no mucinoso

3. Adenocarcinoma invasor

- Predominantemente lepidico (antes llamado patrón bronquiolo alveolar no mucinoso con >5 mm. de invasión)
- Predominantemente acinar

- Predominantemente papilar
- Predominantemente micropapilar
- Predominantemente sólido con producción de mucina

4. Variantes de adenocarcinoma invasor

- Adenocarcinoma invasor mucinoso (antes llamado carcinoma bronquiolo alveolar mucinoso)
- Coloide
- Fetal (alto y bajo grado)
- Entérico

La incidencia relativa del adenocarcinoma ha incrementado dramáticamente, junto con una disminución correspondiente de los otros subtipos de CPCNP (especialmente el carcinoma epidermoide) y CPCP. Este incremento en la incidencia del adenocarcinoma se infiere es secundaria a la introducción de los cigarrillos con filtro en 1960, aunque esta relación no se ha comprobado por completo y necesita de más estudios que lo corroboren.(47)

Pronóstico

El **estadio al diagnóstico**, es el factor con mayor impacto en el pronóstico de los Pacientes. Para la revisión del sistema TNM en la séptima edición de la AJCC, se revisaron más de treinta y un mil casos de la base de datos del Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) de los Estados Unidos. Los resultados demostraron un pronóstico sombrío aún en los estadios más tempranos (IA con una mediana de supervivencia global de 60 meses) y peor en los estadios avanzados (seis meses de mediana de supervivencia en el estadio IV). (**Tabla 4**) (48)

En los Pacientes con enfermedad metastásica, existen estudios que han asociado diferentes **parámetros clínicos** con un pronóstico pobre en la supervivencia. Un modelo identificó las siguientes variables como de peor pronóstico en cáncer de pulmón avanzado: metástasis en piel (HR 1.88), ECOG 1 - 2 (HR 1.46); pérdida de apetito (HR 1.62), metástasis hepáticas (HR 1.32), ≥ 4 sitios metastásicos (HR 1.20) y no cirugía previa (HR 1.32).(49) Otros factores predictivos reconocidos en enfermedad metastásica, son las mutaciones en el gen EGFR y el gen fusión EML4 - ALK, cuyo impacto en el pronóstico y tratamiento ha sido discutidos previamente

En cuanto a los **hallazgos de la histopatología**, se han descrito algunas variables que tienen impacto en el pronóstico de los Pacientes con **cáncer de pulmón resecable**. Existen resultados divergentes en cuanto al pronóstico de los Pacientes dependiendo de la histología tumoral (adenocarcinoma vs. carcinoma epidermoide).(50, 51) Otra variable con resultados no definitivos son el grado de diferenciación tumoral en Pacientes con enfermedad operable (a menor diferenciación peor pronóstico).(52, 53) La **invasión vascular** tiene un impacto negativo en el pronóstico de los Pacientes con tumores T1-2 N0. Una serie de 746

Pacientes, identificó permeación vascular microscópica en 257 individuos (34%) y comparado con aquellos que no tuvieron invasión vascular, la supervivencia global a cinco años fue peor en aquellos con invasión microscópica a vasos (65 vs. 55% respectivamente).(54)

Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL)

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), también se conoce con los nombres de como lipocalina – 2, siderocalina, uterocalina y 24p3. Es una proteína de 25 kDa perteneciente a la superfamilia de lipocalinas, las cuales desempeñan el papel de transportadores de sustancias hidrofóbicas. En particular, la NGAL captura hierro en el espacio extracelular, transportándolo al espacio intracelular a través de su receptor transmembrana específico (24p3R, megalina), aumentando los niveles intracelulares de hierro. Este es el mecanismo que relaciona a la NGAL con su función en la inmunidad innata al ser liberado por los neutrófilos. Esto a su vez llevó al descubrimiento de que la NGAL se libera como una proteína de fase aguda en la inflamación, activando vías enzimáticas dependientes de hierro.(55)

Sin embargo, recientemente se ha encontrado a la NGAL como un participante activo en el proceso de crecimiento y diferenciación de tejidos desde la etapa embrionaria, lo que se traduce en un regulador fisiológico de la multiplicación celular. De hecho, se ha descubierto que su unión con el receptor 24p3R regula la proliferación celular mediante un mecanismo de depleción o aumento del hierro intracelular, el cual deriva a la célula hacia la apoptosis o hacia la supervivencia celular, respectivamente. Por otro lado, se ha determinado que la NGAL actúa en la carcinogénesis no sólo por las vías mencionadas, sino mediante la regulación de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), ya que forma un homodímero o heterodímero con esta enzima (de aquí su nombre, al ser la MMP-9 una gelatinasa), lo cual protege a esta última de la degradación y, se ha planteado incluso, que acelera su activación.(56)

La relación entre un aumento de la expresión de NGAL en ciertos tipos de cáncer se ha establecido, con resultados variables y contradictorios. A pesar de su claro papel en la proliferación celular y la cooperación en la degradación de la matriz extracelular, los resultados muestran una incipiente relación con un peor estadio clínico patológico, pronóstico y supervivencia en tumores de mama, esófago y estómago(57-61). Existe información no concluyente o controvertida en pacientes con carcinoma renal(62) y de páncreas(63), así como una correlación de pronóstico menos desfavorable en el cáncer anaplásico de tiroides y ovario.(64)

Metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9)

Las metaloproteínasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas que consisten en al menos 28 endopeptidasas dependientes de zinc, las cuales se encargan de la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Esta familia comparte componentes específicos funcionales y estructurales los cuales incluyen

principalmente un péptido – señal hidrofóbico, un dominio de propéptido para la latencia enzimática y un dominio catalítico con un sitio de unión a zinc altamente conservado. Las MMP pueden actuar como enzimas secretadas libres o como proenzimas transmembrana. Ambas requieren activación posterior a su secreción.(65)

Las MMP se encargan de la degradación de los componentes de la MEC en situaciones fisiológicas y patológicas. De estas últimas, la progresión e invasión tumoral es la que concierne a este texto. Se ha descrito el papel de las MMP en este proceso a varios niveles. Por un lado, las MMP modulan las interacciones entre las células dentro del tumor, degradando la E-cadherina en las uniones; y por otro lado modula la relación del tumor con la MEC, procesando sus componentes y sus integrinas, lo que propicia la capacidad de invasión del tumor. Además, las MMP activan moléculas de señalización como citosinas y factores de crecimiento, ya sea liberándolas de la MEC o exponiéndolas de la superficie celular del tumor.(66)

Las MMP se pueden clasificar en 6 subfamilias de acuerdo a su principal sustrato de la MEC, así como su homología en las secuencias del dominio catalítico. Actualmente se reconocen las siguientes subfamilias: matrilisinas, colagenasas, estromelisin, gelatinasas, MMP unidas a membrana y un grupo no clasificable en las anteriores.(67)

Dentro de las gelatinasas se encuentran la MMP-2 (gelatinasa A), y la MMP-9 (gelatinasa B). Las gelatinasas poseen un dominio de unión a colágeno dentro del dominio catalítico. Este dominio posee tres repeticiones de fibronectina tipo II y es responsable de la unión a sustratos de colágena, elastina, ácidos grasos y trombospondina. Esto hace que las gelatinasas puedan degradar varios componentes de la MEC, y a su vez, degradar moléculas que no son parte de la MEC. Las gelatinasas cobran una gran importancia como biomarcadores en el cáncer debido a que se ha demostrado el aumento de su expresión en diversos tumores como mama, colon, páncreas, ovario, próstata, entre otros; y esta expresión aumentada se ha relacionado con un peor pronóstico en estos tumores mencionados.(68)

Hablando en específico de la MMP-9, esta gelatinasa puede degradar los siguientes sustratos:(69)

1. **Sustratos de la MEC:** Colágenos III, IV y V, gelatina, elastina, vitronectina, entactina.
2. **Otros sustratos:** proTGF- β , proTNF- α , IL-2R α , ICAM-1, EGFR-1, Kit-ligando, CXCL1/GRO- α , CXCL4/PF4, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC, CXCL12/SDF-1, α 1-inhibidor de proteinasa, plasminógeno, KISS-1, IFN- β .

La MMP-9 descubre sitios específicos de la MEC al degradarla, los cuales son

críticos para la angiogénesis. Además, a través de esta degradación, pone al descubierto factores de crecimiento secuestrados dentro de la MEC, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), TGF- β y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2).(70)

A su vez, las gelatinasas exponen y activan TNF- α , TGF- β e IL-1 β , íntimamente relacionadas con la regulación del crecimiento, angiogénesis e inflamación. También procesan la proteína supresora de tumores kisspeptina (KiSS-1) para generar metastina, molécula que aumenta el potencial invasivo del tumor.(71)

MMP-9 degrada el interferón IFN β (IFN- β), lo cual disminuye la actividad inmune antiviral en el tumor; disminuye la proliferación de linfocitos T al degradar el receptor α de la Interleucina 2 (IL-2R α), lo cual puede ser parte de la inmunosupresión inducida por el tumor; libera Kit-ligando, mismo que juega un papel importante en el crecimiento tumoral y la angiogénesis; y expone la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la cual ayuda al tumor a escapar de la citotoxicidad mediada por células natural-killer (NK).(72)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. El pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón es pobre aun en estadios tempranos y la recurrencia posterior a tratamiento quirúrgico con intento curativo es alto.

Existen marcadores moleculares cuya expresión en células tumorales han predicho supervivencia y respuesta al tratamiento en pacientes seleccionados con adenocarcinoma de pulmón. Existen algunas moléculas como el NGAL y MMP-9 que han demostrado un valor importante en la génesis del tumor, invasión y metástasis, así como valor en el pronóstico de los pacientes en diversos tumores. En la literatura mundial publicada no existen estudios que combinen la determinación de estas moléculas y su asociación con pronóstico o supervivencia en adenocarcinoma de pulmón.

Hipótesis

La expresión aumentada, determinada por inmunohistoquímica de las moléculas NGAL y MMP-9 en tejido de adenocarcinoma pulmonar, se asocia con una disminución en la supervivencia.

Objetivos

Determinar si existe relación entre la expresión aumentada en el tejido tumoral de las moléculas NGAL y MMP-9 con la supervivencia de los Pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en el Centro Oncológico Integral “Diana Laura Riojas de Colosio” en conjunto con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Médica Sur. Se revisaran los casos de pacientes con adenocarcinoma de pulmón de 2005 al 2013. Se excluyeron Pacientes con información clínica incompleta en el expediente, con muestra de tejido ausente o insuficiente para poder realizar las tinciones de inmunohistoquímica.

Se determinaron variables clínicas que incluyeron:

- Género
 - Mujer
 - Hombre
- Edad y fecha de diagnóstico
- Antecedente de tabaquismo e índice tabáquico
- Antecedente de Diabetes mellitus e Hipertensión arterial sistémica
- Exposición al humo de leña
- Niveles séricos de antígeno carcinoembrionario (ACE) al diagnóstico
- Mutación de EGFR o ALK

- Tipo de adenocarcinoma pulmonar
 - No específico, lepidico, acinar, papilar, sólido, micropapilar y otros (sarcomatoide, coloide, fetal o entérico)
- Diferenciación de acuerdo a observación cualitativa
 - Poco diferenciado
 - Moderadamente diferenciado
 - Bien diferenciado
- Permeación vascular
- Invasión perineural
- Estadío de acuerdo al sistema TNM
- Fecha de progresión
- Vivo o Muerto
 - Fecha de último seguimiento o defunción

Se realizó inmunohistoquímica para:

- Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
- Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9)

Técnica de inmunohistoquímica

Se obtuvieron los bloques en parafina de las biopsias encontradas y se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Se colocaron en laminillas electro-cargadas Fisherbrand® (Fisher Scientific), las cuales se calentaron en la estufa de secado a una temperatura de 60°C por 35 minutos. Posteriormente se desparafinaron y rehidrataron con baños en el orden siguiente; xilol, etanol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. Se colocaron las laminillas con los cortes mencionados en solución amortiguadora (buffer) de citratos, se calentaron a presión durante dos minutos y una vez enfriados a temperatura ambiente se lavaron con agua destilada y se colocaron en el rack para añadir solución buffer de fosfatos (PBS) para realizar lavados. Se añadió peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% para inactivar los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos durante 6 minutos y se lavó posteriormente tres veces con PBS con secado con papel absorbente. Las inmuno – tinciones se realizaron utilizando el método estándar de avidina – peroxidasa. Los siguientes anticuerpos fueron estudiados con sus controles apropiados: se añadieron los anticuerpos diluidos en solución especial para este efecto (BSB 0105, BioSB Inc.). Se usaron anticuerpos anti lipocalina-2 (GTX63306, GeneTex Inc.) y anti metaloproteinasa 9 (GTX100458, GeneTex Inc.) Se dejó incubar el anticuerpo por 55 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retiró con papel absorbente, se lavaron tres veces las laminillas con PBS y se aplicó un sistema de detención de marca (BSB 0007, BioSB Inc.). Se incubaron con biotina por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS.

Seguido de esto se incubaron con estreptoavidina por otros 10 minutos y se lavaron de nuevo con PBS. Para el revelado de las tinciones con el anticuerpo se añadió diaminobenzidina de manera manual, observando al microscopio óptico para evitar la sobreexposición de la tinción. Se sumergieron en agua las laminillas

para posteriormente añadir hematoxilina por 15 segundos. Se lavaron de nuevo las laminillas con agua y se sumergieron en solución de carbonato de litio para “virar” la hematoxilina. Se deshidrataron con baños consecutivos en el siguiente orden: alcohol al 96 %, etanol absoluto y xilol por dos minutos cada uno. Se montaron en resina permanente para microscopía y se colocaron cubreobjetos para su valoración por un Patólogo experto.

ANTICUERPO	CLONA	MARCA	DILUCIÓN
NGAL	EPR5084	GeneTex®	1:100
MMP9	N2C1	GeneTex®	1:200

Interpretación de los anticuerpos

Para registrar la positividad de las inmuno – reacciones se usó un sistema cualitativo y cuantitativo determinado por la observación directa al microscopio de luz. Para evaluar la efectividad de los anticuerpos se valoró que los testigos marcaran adecuadamente en cada laminilla. El tejido utilizado como testigo para evaluar la positividad de NGAL-2 fue la tinción intensa (3+) en el citoplasma de las células glandulares del endo – cérvix. El testigo utilizado para evaluar la reactividad de MMP-9 fue la positividad intensa (3+) en el citoplasma de macrófagos alveolares. Se utilizó una escala de 1+ para una tinción débil hasta 3+ para una tinción muy intensa, para ambos anticuerpos en el citoplasma de las células tumorales. De la misma forma, en cada caso se determinó el porcentaje de las células neoplásicas que mostraron positividad débil a intensa.

Análisis estadístico

Las variables continuas para fines descriptivos, fueron agrupadas como medias y medianas aritméticas y desviaciones estándar. Las variables categóricas consistieron en porcentajes con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Las comparaciones inferenciales se hicieron con utilizando la prueba *t* de Student o la prueba *U* de Mann – Whitney, de acuerdo con la distribución de los datos (normal o anormal) determinado por la prueba de Kolmogorov – Smirnov. La prueba de χ^2 o prueba exacta de Fisher se utilizaron para evaluar la significancia estadística de las variables categóricas, determinado como $P < 0.05$ usando prueba de dos colas. Las variables estadísticamente significativas y limítrofes ($P < 0.01$) se incluyeron en el análisis multivariado de regresión logística. La SG se analizó utilizando el método de Kaplan- Meier, mientras que las comparaciones entre los subgrupos se analizaron utilizando log Rank o prueba de Breslow, si las dos curvas de supervivencia de cruzaban. Para el análisis de la curva de supervivencia, todas las variables se dicotomizaron (para edad utilizamos mediana). Para el ajuste de las potenciales variables de confusión se utilizó el modelo de regresión de Cox multivariado y la tasa de riesgo relativo (HR), con sus respectivos intervalos de confianza (IC 95%) como medida de asociación. La significancia estadística se determinó con una $P < 0.05$ utilizando una prueba de dos colas. Para todo el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 19 (IBM).

RESULTADOS.

Características generales de la población

Se lograron identificar un total de 41 Pacientes que cumplieron los criterios de inclusión para el estudio dentro del marco de tiempo de 2005 - 2013. La media de edad fue de 61.4 ± 10.1 años, el 53.7% eran mujeres y 46.3% hombres. El 75.6% de los pacientes tenía antecedente de tabaquismo.

El patrón de adenocarcinoma más común fue el no especificado (70.7%), seguido de lepidico (14.6%), otros (9.8%), papilar (2.4%) y sólido (2.4%). El grado de diferenciación fue en la mayoría moderadamente diferenciado (53.7%), seguido de poco diferenciado (39.1%) y bien diferenciado (7.3%). Hubo permeación vascular en el 68.3% e invasión perineural en el 9.8% de todos los Pacientes.

La distribución de estadios fue la siguiente: I (19.5%), II (12.2%), III (19.5%) y IV (48.8%). Todos los Pacientes recibieron como primera línea de tratamiento quimioterapia citotóxica basada en platino. La mediana de seguimiento de todos los Pacientes fue de 25.6 ± 32.2 meses. Las características de los Pacientes se encuentran registradas en la **Tabla – 5**.

Expresión de NGAL y MMP – 9 por inmunohistoquímica

De los 41 Pacientes, 39 expresaron NGAL (95.12%) (**Figura 1**) y de ese mismo número de Pacientes fueron 31 individuos (75.60%) los que tuvieron expresión de MMP – 9 en el tejido tumoral (**Figura 2**). Ninguno de los pacientes que no expresaron NGAL tuvo expresión de MMP-9. La intensidad y porcentaje de expresión en cada uno de los Pacientes, se enuncia en la **Tabla – 6**. No encontramos relación entre la intensidad y porcentaje de NGAL relacionada con la intensidad y porcentaje de MMP – 9. Se determinó la media de expresión de NGAL en 70% y MMP – 9 en 30%.

Supervivencia global (SG)

La mediana de SG fue de 17.0 meses con un intervalo de 4.7 – 29.2 meses. El estadio al diagnóstico influyó en la SG de los Pacientes, estadios I y II (media no alcanzada), estadio III (media de 15.57 meses [IC 95%; 9.8 – 21.2]) y estadio IV (media de 9.6 meses [IC 95%; 0.8 – 18.4 meses]; $P = 0.002$).

La media de SG en paciente con expresión de NGAL <70% fue de 45.7 meses (IC 95%; 15.2 – 76.2) y para los Pacientes con expresión $\geq 70\%$ fue de 4.6 meses (IC 95%; 0.5 – 18.8). Al ser analizado este desenlace fue estadísticamente significativo ($P < 0.0001$) (**Figura 3**).

Para MMP – 9 la media de SG para los pacientes con expresión de MMP – 9 < 30% fue de 49.9 meses (IC 95%; 11.0 – 88.7) y para aquellos con $\geq 30\%$ la media de SG fue de 39.4 meses (IC 95%; 24.0 – 54.8). No se encontró diferencia estadística entre ambos grupos ($P = 0.49$). (**Figura 4**). Tampoco se encontraron

diferencias en SG para sexo, tabaquismo, permeación vascular ni grado de diferenciación.

En el análisis multivariado, se mantuvieron estadísticamente significativos para pronóstico los mismos factores mencionados previamente: el estadio al diagnóstico (HR 2.18 [IC 95%; 1.3 – 3.6]) $P < 0.003$) y la expresión $\geq 70\%$ de NGAL (HR 4.7 [1.6 – 13.1] $P < 0.003$). Las características clínicas asociadas con SG se presentan en la **Tabla – 7**.

DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón representa la principal causa de muerte por neoplasias malignas en el mundo. (1) El **estadio al diagnóstico**, es el factor con mayor impacto en el pronóstico de todos los subgrupos de Pacientes. A pesar de tratamientos novedosos la supervivencia ha sido baja aún en los estadios más tempranos (IA con una mediana de supervivencia global de 60 meses) y menor en los estadios avanzados (mediana de supervivencia de 6 meses en estadio IV).(48) Debido al impacto del TNM, además de utilizarlo para la clasificación de los Pacientes, se usa para determinar el tratamiento más adecuado dependiente del estadio al diagnóstico. Los estadios I y II se benefician del tratamiento con resección quirúrgica y en algunos casos específicos de quimioterapia adyuvante, los estadios III tiene un tratamiento más dinámico que puede combinar incluso las tres modalidades de cirugía, quimioterapia y radioterapia y los estadios IV de forma general sólo se benefician del uso de quimioterapia o tratamiento molecular dirigido con intención paliativa.(73) En algunas situaciones el TNM sólo refleja la extensión anatómica del crecimiento tumoral sin tener correlación con la progresión y/o supervivencia global de los Pacientes. Existe evidencia que aún en estadios tempranos el pronóstico puede ser incluso más agresivo de lo esperado, reflejado con una rápida progresión de la enfermedad loco – regional o a distancia.(74) De aquí la importancia de identificar al subgrupo de individuos que se encuentra dentro de este grupo de riesgo.

Estudios recientes han descrito algunas variables histopatológicas que tienen impacto en el pronóstico de los Pacientes con cáncer de pulmón resecable. Existen resultados divergentes en cuanto al pronóstico de los Pacientes dependiendo de la histología tumoral (adenocarcinoma vs. carcinoma epidermoide).(50, 51) Otra variable con resultados no definitivos son el grado de diferenciación tumoral en Pacientes con enfermedad operable (a menor diferenciación peor pronóstico).(52, 53) La invasión vascular tiene un impacto negativo en el pronóstico de los Pacientes con tumores T1-2 N0. Una serie de 746 Pacientes, identificó permeación vascular microscópica en 257 individuos (34%) y comparado con aquellos que no tuvieron invasión vascular, la supervivencia global a cinco años fue peor en aquellos con invasión microscópica a vasos (65 vs. 55% respectivamente).(54) De aquí se desprende la gran importancia de identificar nuevos marcadores pronósticos por histopatología, para utilizarlos de forma conjunta con el TNM y permitir una mejor selección del tratamiento para cada Paciente y evitar una terapéutica tanto limitada como muy agresiva.

En el presente trabajo la expresión de NGAL fue pronóstica para supervivencia global en todos los Pacientes y no sólo limitada esta información a aquellos con enfermedad operable, a diferencia de lo que sugieren los trabajos antes mencionados. Se demostró en el análisis multivariado que NGAL como factor pronóstico es independiente del estadio al diagnóstico, correlacionando con un pronóstico menos favorable para todos aquellos con expresión $\geq 70\%$ en el tejido tumoral. En nuestro conocimiento, sólo existe un estudio que ha evaluado el papel de la expresión NGAL como marcador de resistencia a TKIs EGFR en líneas celulares de cáncer de pulmón(75), pero no existe algún reporte en la literatura

que haya evaluado el papel pronóstico de NGAL en pacientes con CPCNP, tampoco que haya sido limitado a sólo el subgrupo de adenocarcinoma pulmonar y mucho menos realizado en conjunto con la expresión tanto de NGAL como de MMP – 9. Existen reportes del valor pronóstico negativo de NGAL y también similar al presente estudio, de forma independiente de la expresión de MMP – 9 en Pacientes con adenocarcinoma de colon estadio I(59). Otros tumores sólidos donde se ha identificado el valor pronóstico negativo de NGAL son cáncer de mama, esófago y estómago(57-61). Existe información no concluyente o controvertida en pacientes con carcinoma renal(62) y de páncreas(63), así como una correlación de pronóstico menos desfavorable en el cáncer anaplásico de tiroides y ovario.(64) Nuestros resultados pueden sugerir, que al identificar pacientes con un peor pronóstico al sobre expresar NGAL $\geq 70\%$ en el tejido tumoral, independientemente de su estadio de presentación, se les pudiera ofrecer ya sea un tratamiento con quimioterapia más intenso (ya sea en el contexto adyuvante o metastásico) y una vigilancia más estrecha. Por el contrario, en los pacientes que no tienen expresión elevada de NGAL, se pudiera evitar el sobre tratamiento y una vigilancia menos estricta por el buen pronóstico de su enfermedad.

Por otro lado, se ha determinado que NGAL es un participante activo en el proceso de crecimiento y diferenciación de tejidos desde la etapa embrionaria, lo que se traduce en un regulador fisiológico de la multiplicación celular. De hecho, se ha descubierto que su unión con el receptor 24p3R regula la proliferación celular mediante un mecanismo de depleción o aumento del hierro intracelular, el cual deriva a la célula hacia la apoptosis o hacia la supervivencia celular, respectivamente.(76) En la presente serie, suponemos que la gran expresión de NGAL en nuestro grupo de Pacientes (95.12%) es secundaria al aumento requerido de hierro en la génesis tumoral del CPCNP(77) además que se sabe que la depleción de este mineral conlleva al arresto del ciclo celular y apoptosis.(78) NGAL también actúa en la cantero – génesis no sólo por las vías mencionadas, sino mediante la regulación de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), ya que forma un homodímero o heterodímero con esta enzima (de aquí su nombre, al ser la MMP-9 una gelatinasa), lo cual protege a esta última de la degradación y, se ha planteado incluso, que acelera su activación.(56) MMP – 9 y su expresión como factor pronóstico desfavorable ha sido estudiada extensamente en CPCNP(79-87) además de ser un posible blanco terapéutico en este grupo de Pacientes.(67, 88-90).

En nuestra serie no encontramos significancia pronóstica en la expresión de MMP – 9 con el desenlace de SG o alguna correlación en conjunto con la expresión de NGAL. Esto sugiere que NGAL, y el peor pronóstico de los Pacientes que lo sobre - expresan en tejido tumoral de CPCNP, puede ser independiente a la regulación de MMP – 9. Lo anterior no ha sido documentado en CPCNP, pero si en líneas celulares de adenocarcinoma de colon. En el estudio anterior, a diferencia de la relación positiva entre ambos marcadores en cáncer de colon que previamente se había publicado(91), se observó que la expresión de NGAL promueve el potencial de invasión y metástasis mediante un mecanismo dependiente de hierro en las

células malignas al disminuir la adhesión inter – celular mediada por E – cadherina. (92) Esto sugiere una nueva estrategia terapéutica para investigar la inhibición de NGAL con medicamentos quelantes de hierro como agentes anti – neoplásicos. Estos medicamento inhiben la proliferación celular al disminuir la reserva de hierro y sus proteínas transportadores como NGAL. Lo anterior ya ha sido investigado en algunas neoplasias malignas en modelos animales con resultados prometedores.(93, 94)

CONCLUSIÓN

En este grupo de Pacientes con adenocarcinoma de pulmón, la sobre expresión de NGAL mayor o igual a 70% en tejido tumoral, confiere un peor pronóstico de SG comparado con los que no lo sobre – expresan y este resultado es independiente del estadio al diagnóstico. No se encontró significancia estadística pronóstica para expresión de MMP-9, así como tampoco alguna correlación de este marcador con NGAL, lo que sugiere un mecanismo independiente para la invasión y metástasis de NGAL en el adenocarcinoma de pulmón. El valor pronóstico de NGAL en adenocarcinoma de pulmón documentado en la presente serie, se encuentra actualmente validándose en una serie más grande de Pacientes y de forma multi – institucional.

Tablas y figuras.

Tabla 1. Alteraciones moleculares conocidas en cáncer de pulmón.(24)

Anormalidades	CPCP	CPCNP
Inestabilidad micro – satélite	~35%	~22%
Lazos autócrinos	Receptor GRP/GRP; SCF/KIT	TGF- α /EGFR; heregulina/ERBB2; HGF/MET
Mutación puntual en RAS	<1%	15%–20%
Mutación EGFR	<1%	<10% (Occidente), ~40% (Asia)
EML4-ALK	0%	3%–7%
Sobre expresión de la familia MYC	15%–30%	5%–10%
Inactivación de p53	~90%	~50%
Inactivación de Rb	~90%	15%–30%
Inactivación de p16INK4A	0%–10%	30%–70%
Inactivación de LKB1	~40%–60% (IHQ)	20%–40%
Pérdidas de alelos frecuentes	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p, 22q	3p, 6q, 8p, 9p, 13p, 17p, 19q
Actividad de telomerasa	~100%	80%–85%
Expresión de BCL2	75%–95%	10%–35%

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; GRP: Péptido relacionado a gastrina; HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos; Rb: Proteína de Retinoblastoma; SCF: Factor de crecimiento de colonias; TGF- α : Factor de crecimiento transformador - α ; IHQ: Inmunohistoquímica.

Tabla 2. Síntomas comunes en el cáncer de pulmón.(38, 39)

Síntoma	Pacientes (Porcentaje)
Tos	45 – 74%
Pérdida de peso	46 – 68%
Disnea	37 – 58%
Dolor torácico	27 – 49%
Hemoptisis	27 – 29%
Dolor óseo	20 – 21%
Disfonía	8 – 18%

Tabla 3. Clasificación TNM del cáncer de pulmón. (44, 48)

Séptima Edición de la AJCC TNM de los Tumores Pulmonares	
T (Tumor primario)	Definición
Tx	Tumor que no puede ser evaluado o no se detecta radiológica o broncoscopia pero que se corrobora histopatológicamente (Células malignas en secreciones broncopulmonares).
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor con las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Tamaño ≤ 3 cm. • Localización en vía aérea: en bronquio lobar o más distal. • Invasión local: ninguna, rodeado por pulmón o pleura visceral. • Subdivisiones: T1a (tamaño ≤ 2 cm) y T1b (2 cm < tamaño ≤ 3 cm).
T2	Tumor con tamaño >3 cm pero ≤ 7 cm o tumor con cualquiera de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Localización en vía aérea: Involucro del bronquio principal (distancia a la carina ≥ 2 cm) o presencia de atelectasia o neumonitis obstructiva que se extienda hacia la región hilar pero que no involucre el pulmón entero. • Invasión local: Involucro de pleura visceral. Subdivisiones: T2a (3 cm < tamaño ≤ 7 cm).
T3	Tumor >7 cm en tamaño o tumor con cualquiera de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Localización en vía aérea: tumor en bronquio principal (a 2 cm de la carina), o tumor con atelectasia o neumonitis del pulmón entero. Invasión local: invasión directa de la pared torácica (incluyendo Tumores del <i>sulcus</i> superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastinal o pericardio parietal. <ul style="list-style-type: none"> • Nódulo(s) tumoral(es) satélite(s) en el mismo lóbulo que el tumor primario.
T4	Tumor de cualquier tamaño que invada cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, o carina; o tumor con nódulo(s) tumoral(es) satélite(s) en un lóbulo diferente, ipsilateral al tumor primario.
N (Ganglios linfáticos)	Definición

NX	No pueden ser evaluados los ganglios linfáticos regionales.
N0	Ausencia de involucro de ganglios linfáticos regionales.
N1	Presencia de metástasis a ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales (incluyendo extensión directa a ganglios intrapulmonares).
N2	Presencia de metástasis a ganglios linfáticos ipsilaterales mediastinales y/o subcarinales.
N3	Presencia de metástasis a cualquiera de los siguientes grupos de ganglios linfáticos: mediastinal contralateral, hilar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclaviculares.
M (Metástasis)	Definición
M0	Ausencia de metástasis distantes.
M1	Presencia de metástasis distantes. <ul style="list-style-type: none"> • Subdivisiones: • M1a – Nódulo(s) tumoral(es) satélite(s) en lóbulo contralateral al del tumor primario o tumores con derrame pleural maligno o derrame pericárdico. • M1b – Metástasis distantes.

T / N	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

Tabla 4. Supervivencia global en pacientes con CPCNP de acuerdo al estadio al diagnóstico. (48)

	Muertos	SG mediana	SG a 5 años (%)
IA	443 / 831	60 meses	50%
IB	750 / 1284	43 meses	43%
IIA	318 / 483	34 meses	36%
IIB	1652 / 2248	18 meses	25%
IIIA	2528 / 3175	14 meses	19%
IIIB	676 / 758	10 meses	7%
IV	2627 / 2757	6 meses	2%

Tabla 5. Características basales de la población

Característica	Total	Porcentaje
Sexo		
Femenino	22	53.7%
Masculino	19	46.3%
Edad		
Media	61.41 ± 10.10	
Rango	39 – 80 años	
Tabaquismo		
No	10	24.4%
Sí	31	75.6%
Índice tabáquico (media)	28.4 ± 31.2	
Rango	0 - 100	
HAS		
No	27	65.9%
Sí	14	34.1%
DM2		
No	39	95.1%
Sí	2	4.9%
Patrón adenocarcinoma		
Lepídico	6	14.6%
Papilar	1	2.4%
Sólido	1	2.4%
Otros	4	9.8%
No especificado	29	70.7%
Grado de diferenciación		
Bien diferenciado	3	7.3%
Moderadamente diferenciado	22	53.7%
Poco diferenciado	16	39.1%
Permeación vascular		
Sí	28	68.3%
No	13	31.7%
Invasión perineural		
Sí	4	9.8%
No	37	90.2%
Estadio al diagnóstico		
I	8	19.5%
II	5	12.2%
III	8	19.5%
IV	20	48.8%
Antígeno carcinoembrionario (ACE) media	20.74 ± 29.3	
Rango	1 – 95.33	
Seguimiento, meses (mediana)	25.65 ± 32.20	
	0 – 156.09	

Tabla 6. Expresión de NGAL y MMP – 9 por intensidad y porcentaje en cada uno de los pacientes.

Paciente	NGAL		MMP – 9	
	Intensidad	Porcentaje	Intensidad	Porcentaje
1	2+	90%	0	0
2	3+	5%	0	0
3	2+	5%	2+	5%
4	3+	95%	2+	20%
5	3+	95%	0	0
6	3+	30%	2+	5%
7	0	0	0	0
8	3+	90%	1+	40%
9	3+	50%	2+	30%
10	2+	5%	3+	5%
11	3+	90%	0	0
12	3+	40%	1+	3%
13	3+	90%	1+	60%
14	3+	70%	1+	20%
15	3+	70%	1+	10%
16	3+	5%	3+	5%
17	3+	40%	2+	50%
18	3+	80%	2+	30%
19	2+	10%	0	0
20	3+	95%	3+	90%
21	3+	90%	2+	90%
22	0	0	0	0
23	3+	60%	0	0
24	3+	80%	2+	90%
25	3+	90%	0	0
26	3+	80%	0	0
27	3+	70%	3+	90%
28	3+	95%	3+	90%
29	2+	5%	1+	30%
30	1+	5%	3+	20%
31	3+	70%	3+	90%
32	3+	90%	2+	80%
33	3+	95%	3+	95%
34	3+	60%	2+	70%
35	3+	70%	2+	70%
36	3+	90%	2+	90%
37	3+	60%	1+	10%

38	3+	60%	2+	70%
39	2+	60%	2+	80%
40	3+	80%	3+	90%
41	3+	30%	2+	40%

Tabla 7. Análisis de supervivencia global (SG) en Pacientes con adenocarcinoma pulmonar

SG	Media (meses)(IC 95%)	Análisis univariado	Análisis multivariado		
		P	HR	IC 95%	P
Sexo					
Mujer	36.76 (2.5 – 70.9)	0.47			
Hombre	12.38 (3.5 – 21.2)				
Tabaquismo					
Sí	15.5 (8.1 – 23.0)	0.69			
No	36.7 (8.8 – 64.7)				
Permeación vascular					
Sí	17.4 (3.8 – 31.0)	0.68			
No	22.7 (6.2 – 39.2)				
Grado de diferenciación					
Bien diferenciado	45.7 (0.4 – 91.0)	0.78			
Moderadamente diferenciado	22.7 (11.0 – 34.9)				
Poco diferenciado	11.3 (9.6 – 12.9)				
Estadio al diagnóstico					
I y II	NA	0.002	2.18	1.3 – 3.6	0.003
III	15.57 (9.8-21-2)				
IV	9.6 (0.8-18.4)				
NGAL %					
<70%	45.7 (15.2 – 76.2)	<0.0001	4.7	1.6 – 13.1	0.003
≥70%	4.6 (0.5 – 18.8)				
MMP-9					
<30%	49.9 (11.0 – 88.7)	0.49			
≥30%	39.4 (24.0 – 54.8)				

IC: Intervalo de confianza; **HR:** Hazard ratio

Figura 1. Expresión de NGAL en adenocarcinoma pulmonar. Reacción de inmunohistoquímica 3+ y 95% para NGAL en adenocarcinoma de pulmón (campo de 40x).

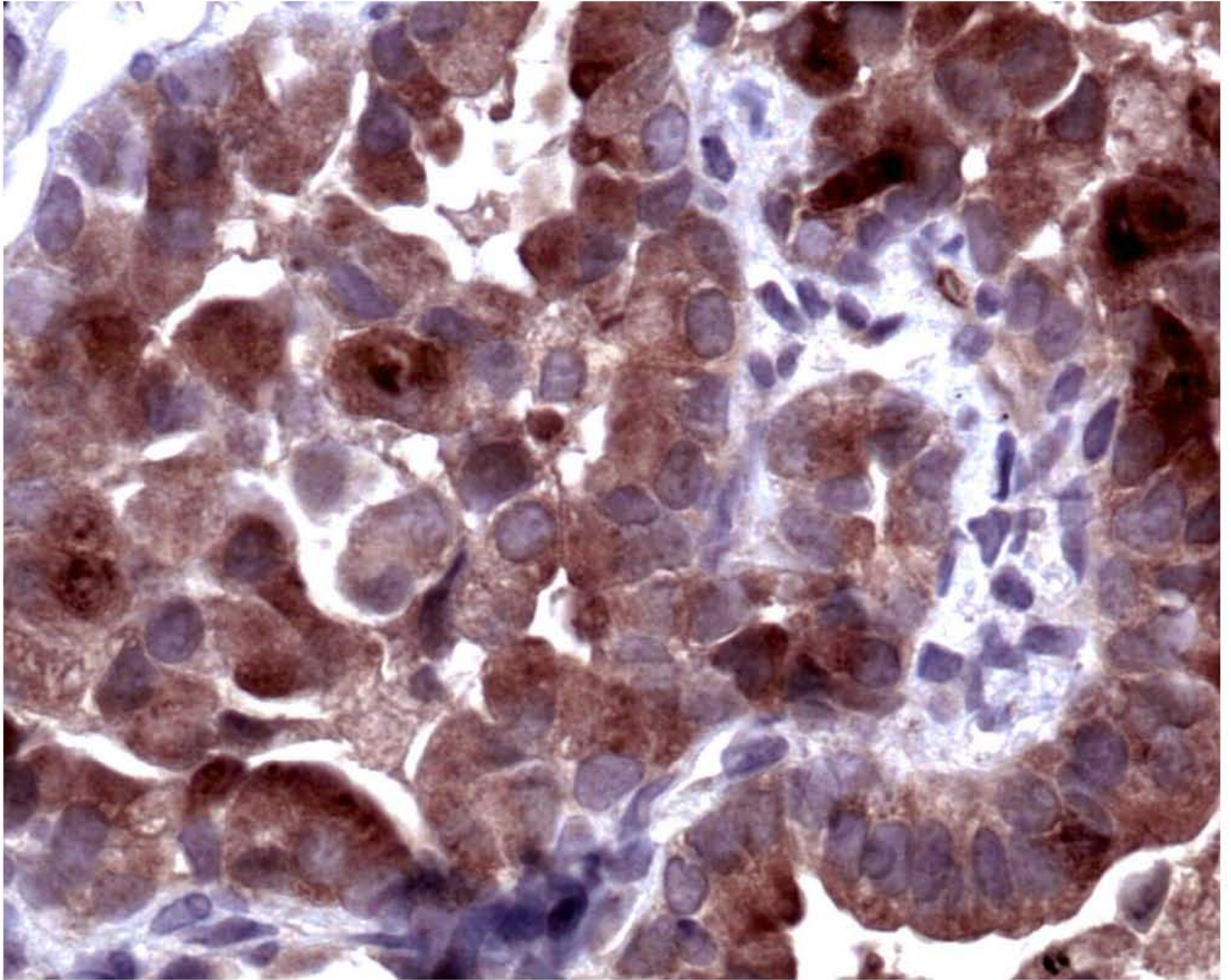


Figura 2. Expresión de MMP – 9 en adenocarcinoma pulmonar. Reacción de inmunohistoquímica 3+ y 95% para metaloproteinasa 9 en adenocarcinoma pulmonar (campo de 40x).

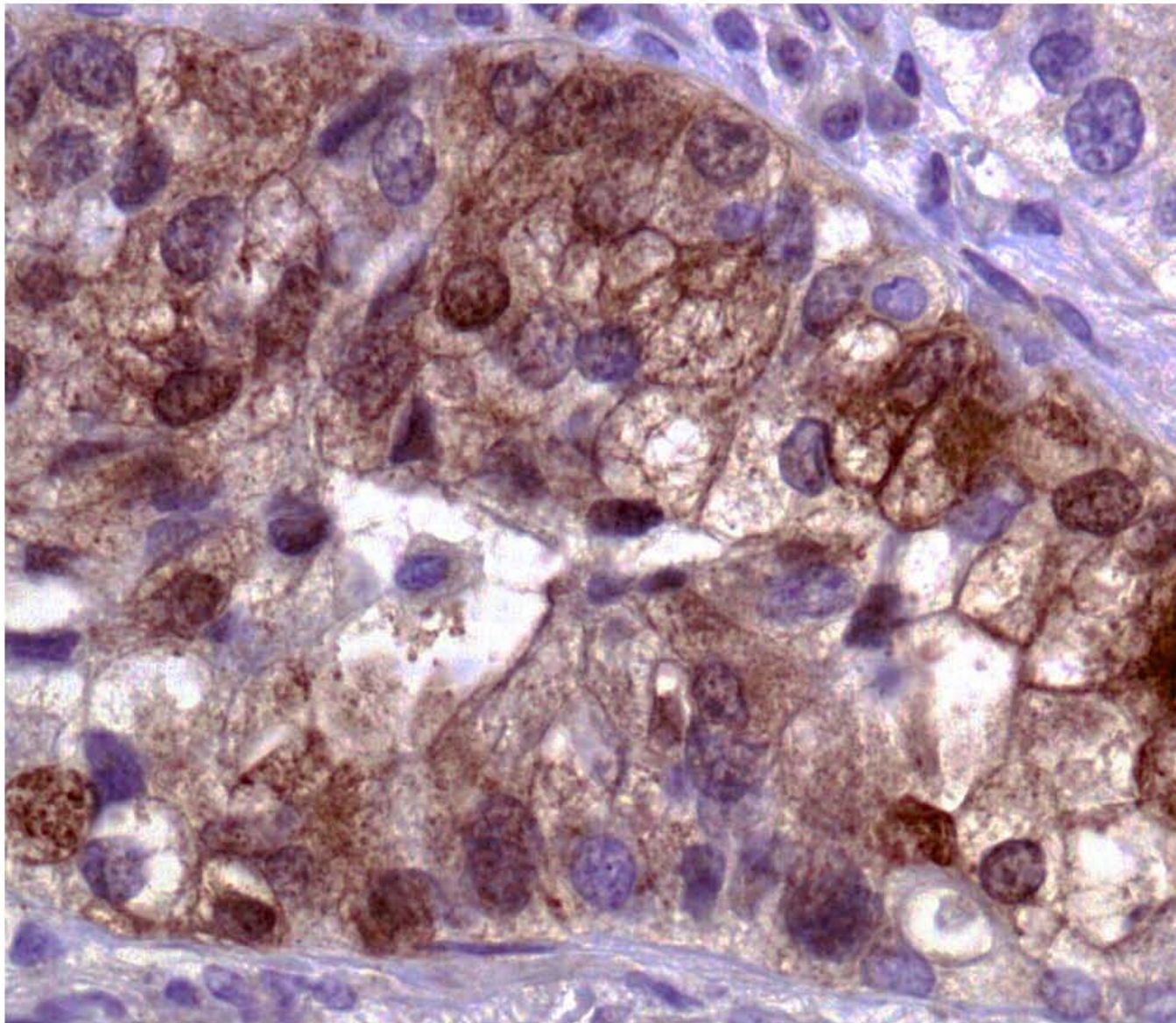


Figura 3. SG media en Pacientes de acuerdo a porcentaje de expresión de NGAL.

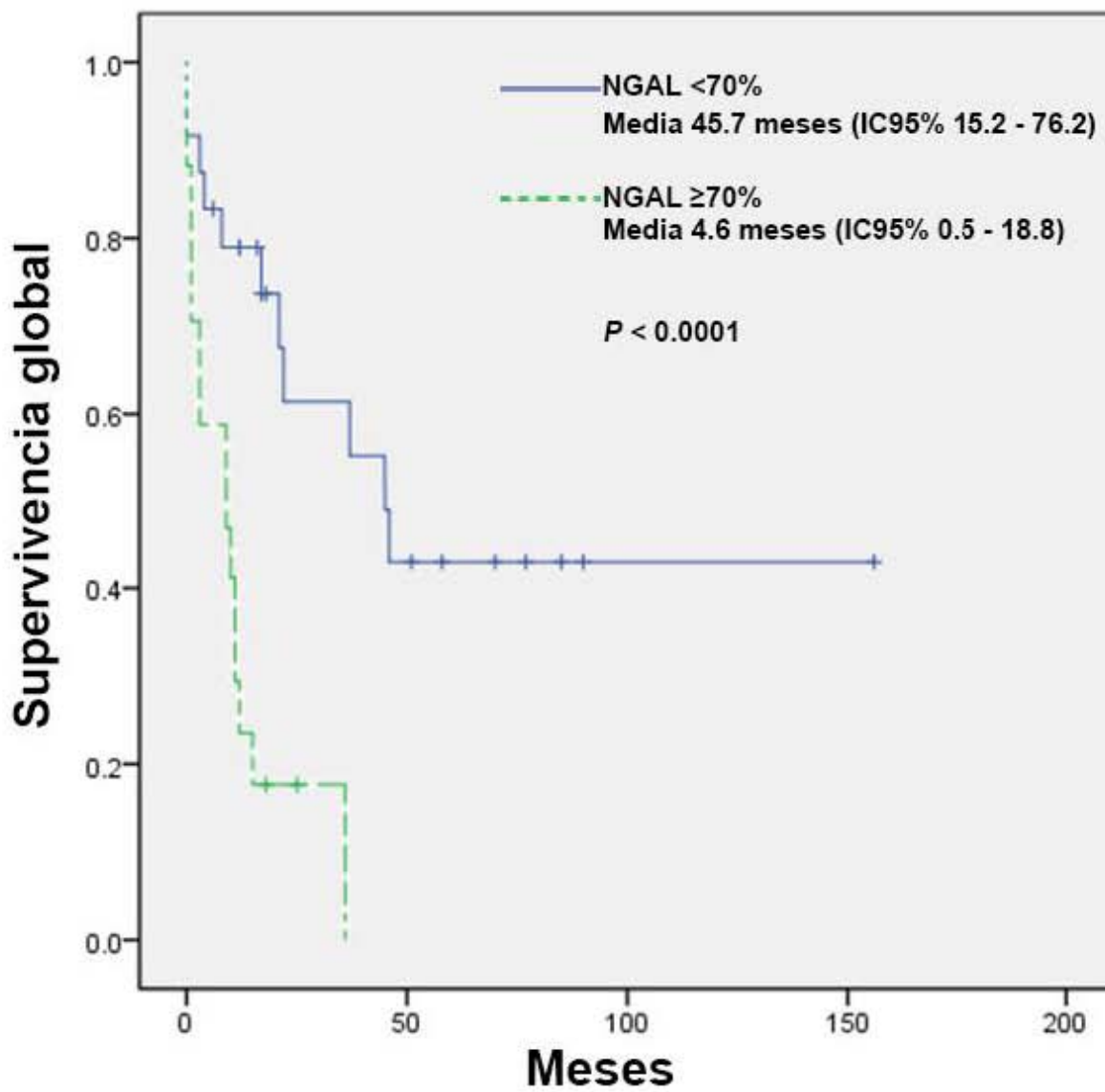
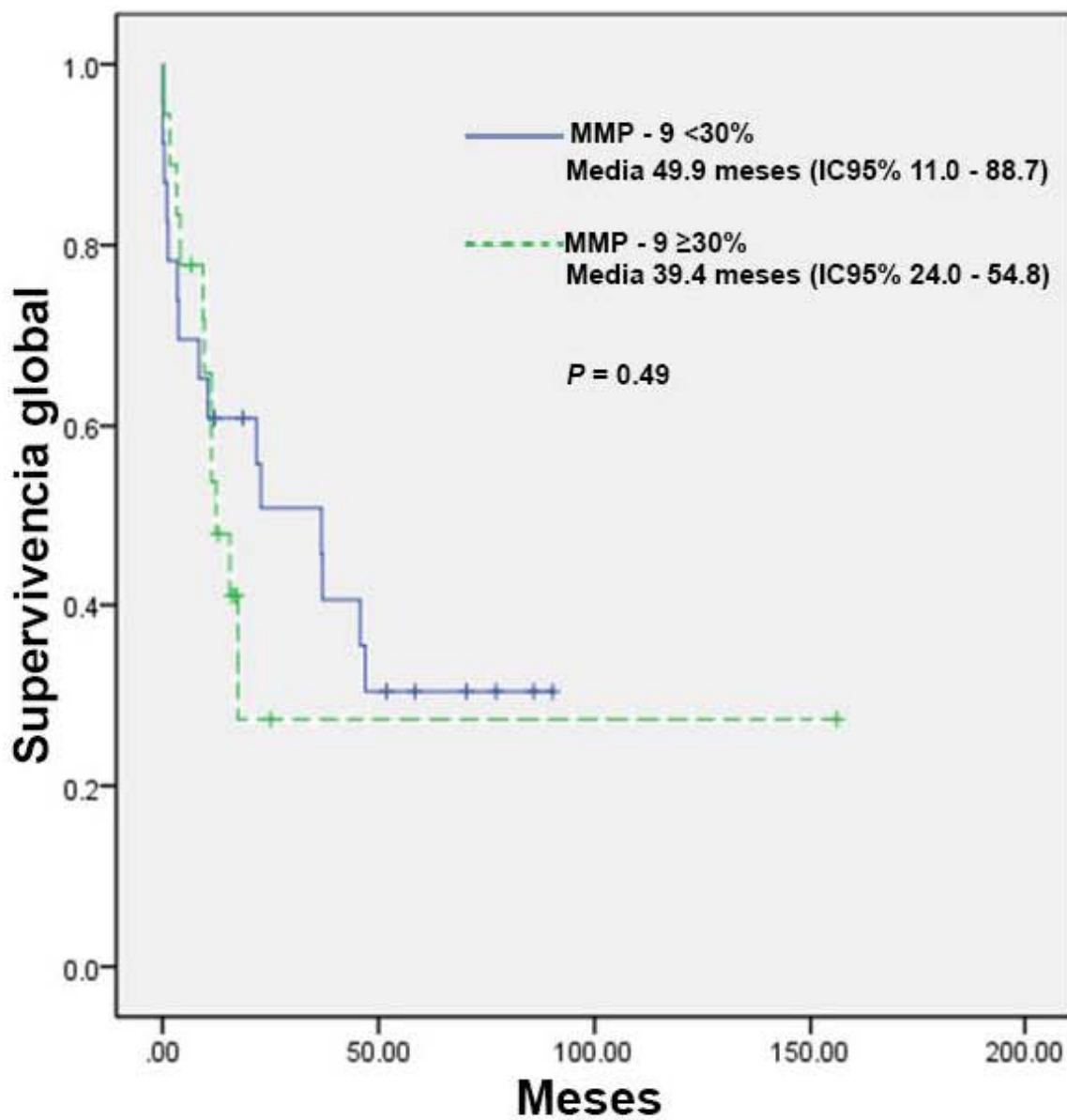


Figura 4. SG media en Pacientes de acuerdo a porcentaje de expresión de MMP - 9.



Fuentes de información.

1. Walker K. International Association for the Study of Lung Cancer - 15th World Conference on Lung Cancer (October 27-31, 2013 - Sydney, Australia). *Drugs of today* (Barcelona, Spain : 1998). 2013;49(12):803-808.
2. GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012. *Globocan Cancer Fact Sheets: Lung Cancer 2014* [17/06/2012]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
3. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):29s-55s.
4. VILLALBA CALOCA J, MARTÍNEZ HEREDERO R. FRECUENCIA DEL CARCINOMA BRONCOPULMONAR EN PACIENTES FUMADORES Y NO FUMADORES DIAGNOSTICADOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN EL AÑO 2001. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004;17:27-34.
5. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(5):561-570.
6. Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *International journal of epidemiology*. 2007;36(5):1048-1059.
7. Gao Y, Goldstein AM, Consonni D, Pesatori AC, Wacholder S, Tucker MA, et al. Family history of cancer and nonmalignant lung diseases as risk factors for lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;125(1):146-152.
8. Amos CI, Pinney SM, Li Y, Kupert E, Lee J, de Andrade MA, et al. A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. *Cancer research*. 2010;70(6):2359-2367.
9. Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, et al. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nature genetics*. 2008;40(12):1407-1409.
10. Truong T, Hung RJ, Amos CI, Wu X, Bickeboller H, Rosenberger A, et al. Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(13):959-971.
11. Raimondi S, Boffetta P, Anttila S, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, et al. Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study. *Mutation research*. 2005;592(1-2):45-57.
12. Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, Chang GC, Tsai YH, Su WC, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung cancer*. 2011;72(3):280-286.
13. Ohtsuka K, Ohnishi H, Kurai D, Matsushima S, Morishita Y, Shinonaga M, et al. Familial lung adenocarcinoma caused by the EGFR V843I germ-line mutation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(8):e191-192.
14. Omenn GS, Merchant J, Boatman E, Dement JM, Kuschner M, Nicholson W, et al. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. *Environmental health perspectives*. 1986;70:51-56.

15. Fraumeni JF, Jr. Respiratory carcinogenesis: an epidemiologic appraisal. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975;55(5):1039-1046.
16. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The lancet oncology*. 2009;10(5):453-454.
17. Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, Leigh J, Concha-Barrientos M, Fingerhut M, et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *American journal of industrial medicine*. 2005;48(6):419-431.
18. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(1):5-8.
19. Kilickap S, Barista I, Ulger S, Celik I, Selek U, Gullu I, et al. Long-term complications in Hodgkin's lymphoma survivors. *Tumori*. 2012;98(5):601-606.
20. Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Friedman DN, et al. Breast Cancer After Chest Radiation Therapy for Childhood Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014.
21. Hulbert A, Hooker CM, Keruly JC, Brown T, Horton K, Fishman E, et al. Prospective CT screening for lung cancer in a high-risk population: HIV-positive smokers. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2014;9(6):752-759.
22. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;330(15):1029-1035.
23. Schuller HM. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(6):455-463.
24. Jacob K, Leora H, David C. Molecular Biology of Lung Cancer. In: DeVita Jr. VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9th ed. USA: LWW; 2011.
25. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science (New York, NY)*. 1996;274(5286):430-432.
26. Phillips DH, Hewer A, Martin CN, Garner RC, King MM. Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature*. 1988;336(6201):790-792.
27. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in chest medicine*. 2011;32(4):703-740.
28. Kris MG, Johnson BE, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, Aronson SL, et al. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1,000 patients with lung adenocarcinoma: The NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(suppl):abstr CRA7506.
29. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(3):169-181.
30. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(9):595-605.

31. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(25):2385-2394.
32. Riely GJ, Kris MG, Zhao B, Akhurst T, Milton DT, Moore E, et al. Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(17):5150-5155.
33. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(8):2240-2247.
34. Jeremy George P, Banerjee AK, Read CA, O'Sullivan C, Falzon M, Pezzella F, et al. Surveillance for the detection of early lung cancer in patients with bronchial dysplasia. *Thorax*. 2007;62(1):43-50.
35. Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(6):547-553.
36. Thomas L, Kwok Y, Edelman MJ. Management of paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Current treatment options in oncology*. 2004;5(1):51-62.
37. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):97s-104s.
38. Chute CG, Greenberg ER, Baron J, Korson R, Baker J, Yates J. Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancer*. 1985;56(8):2107-2111.
39. Hyde L, Hyde CI. Clinical manifestations of lung cancer. *Chest*. 1974;65(3):299-306.
40. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):e142S-165S.
41. Subedi N, Scarsbrook A, Darby M, Korde K, Mc Shane P, Muers MF. The clinical impact of integrated FDG PET-CT on management decisions in patients with lung cancer. *Lung cancer*. 2009;64(3):301-307.
42. Wu Y, Li P, Zhang H, Shi Y, Wu H, Zhang J, et al. Diagnostic value of fluorine 18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for the detection of metastases in non-small-cell lung cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(2):E37-47.
43. De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung cancer. *The European respiratory journal*. 2007;29(5):995-1002.
44. Tsim S, O'Dowd CA, Milroy R, Davidson S. Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Respiratory medicine*. 2010;104(12):1767-1774.
45. WD T, E B, HK M-H. *Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon, France: IARC; 2004.
46. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. *International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european*

respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(2):244-285.

47. Tse LA, Mang OW, Yu IT, Wu F, Au JS, Law SC. Cigarette smoking and changing trends of lung cancer incidence by histological subtype among Chinese male population. *Lung cancer*. 2009;66(1):22-27.

48. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2007;2(8):706-714.

49. Hoang T, Xu R, Schiller JH, Bonomi P, Johnson DH. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on eastern cooperative oncology group data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(1):175-183.

50. Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1995;109(1):120-129.

51. Postoperative T1 N0 non-small cell lung cancer. Squamous versus nonsquamous recurrences. The Lung Cancer Study Group. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1987;94(3):349-354.

52. Harpole DH, Jr., Herndon JE, 2nd, Young WG, Jr., Wolfe WG, Sabiston DC, Jr. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Cancer*. 1995;76(5):787-796.

53. Lipford EH, 3rd, Eggleston JC, Lillemoie KD, Sears DL, Moore GW, Baker RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, nonsmall cell carcinoma of the lung. *The American journal of surgical pathology*. 1984;8(5):357-365.

54. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Buffoni L, Bruna MC, Mossetti C, et al. Significance of the presence of microscopic vascular invasion after complete resection of Stage I-II pT1-T2N0 non-small cell lung cancer and its relation with T-Size categories: did the 2009 7th edition of the TNM staging system miss something? *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(2):319-326.

55. Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, Fazio MR, Bono C, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer letters*. 2010;288(1):10-16.

56. Leng X, Wu Y, Arlinghaus RB. Relationships of lipocalin 2 with breast tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(2):309-314.

57. Wenners AS, Mehta K, Loibl S, Park H, Mueller B, Arnold N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) predicts response to neoadjuvant chemotherapy and clinical outcome in primary human breast cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e45826.

58. Kaur S, Chakraborty S, Baine MJ, Mallya K, Smith LM, Sasson A, et al. Potentials of plasma NGAL and MIC-1 as biomarker(s) in the diagnosis of lethal pancreatic cancer. *PloS one*. 2013;8(2):e55171.

59. Barresi V, Reggiani-Bonetti L, Di Gregorio C, Vitarelli E, Ponz De Leon M, Barresi G. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9

(MMP-9) prognostic value in stage I colorectal carcinoma. *Pathology, research and practice*. 2011;207(8):479-486.

60. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N, Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2008;108(3):389-397.

61. Provatopoulou X, Gounaris A, Kalogera E, Zagouri F, Flessas I, Goussetis E, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP-9/NGAL in breast cancer disease. *BMC cancer*. 2009;9:390.

62. A DIC. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncology letters*. 2013;5(5):1677-1681.

63. Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer research*. 2008;68(15):6100-6108.

64. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1826(1):129-169.

65. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1825(1):29-36.

66. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2012;50(1):12-19.

67. O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance--NO and MMP-9 interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(3):603-617.

68. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5287-5297.

69. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2002;37(6):375-536.

70. Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutation research*. 2013;753(1):7-23.

71. Labrie M, St-Pierre Y. Epigenetic regulation of mmp-9 gene expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(17):3109-3124.

72. Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;622:471-487.

73. National Comprehensive Cancer Network. Non-small cell lung cancer (version 4.2014) 2014 [16/07/2014]. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.

74. Nesbitt JC, Putnam JB, Jr., Walsh GL, Roth JA, Mountain CF. Survival in early-stage non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*. 1995;60(2):466-472.

75. Krysan K, Cui X, Gardner BK, Reckamp KL, Wang X, Hong L, et al. Elevated neutrophil gelatinase-associated lipocalin contributes to erlotinib resistance in non-small cell lung cancer. *American journal of translational research*. 2013;5(5):481-496.
76. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):37258-37265.
77. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer science*. 2009;100(1):9-16.
78. Le NT, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1603(1):31-46.
79. Cao L, Yang H, Hu C. [The expression and its clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2003;6(6):484-487.
80. Iniesta P, Moran A, De Juan C, Gomez A, Hernando F, Garcia-Aranda C, et al. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncology reports*. 2007;17(1):217-223.
81. Liu Z, Xu S, Xiao N, Song C, Zhang H, Li F. [Overexpression of IL-8 and MMP-9 confer high malignant phenotype in patients with non-small cell lung cancer]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2010;13(8):795-802.
82. Ramanujam R, Lin YL, Liu JK, He S. Regulatory expression of MMP-8/MMP-9 and inhibition of proliferation, migration and invasion in human lung cancer A549 cells in the presence of HGF variants. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2013;29(10):530-539.
83. Rollin J, Regina S, Vourc'h P, Iochmann S, Blechet C, Reverdiau P, et al. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2007;56(2):273-280.
84. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovskiy T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of MMP-2 and MMP-9 by cytokines, mitogens and inhibitors in lung cancer and malignant mesothelioma cell lines. *Oncology reports*. 2009;22(6):1283-1291.
85. Schveigert D, Cicenias S, Bruzas S, Samalavicius NE, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. *Advances in medical sciences*. 2013;58(1):73-82.
86. Wang JL, Wu DW, Cheng ZZ, Han WZ, Xu SW, Sun NN. Expression of High Mobility Group Box - B1 (HMGB-1) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(12):4865-4869.
87. Zheng S, Chang Y, Hodges KB, Sun Y, Ma X, Xue Y, et al. Expression of KISS1 and MMP-9 in non-small cell lung cancer and their relations to metastasis and survival. *Anticancer research*. 2010;30(3):713-718.
88. Chang CK, Hung WC, Chang HC. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(6B):2781-2789.
89. Zeng W, Deng L, Zhou R. [Experimental study of targeting MMP-9 deoxyribozyme role of adhesion and migration in human lung adenocarcinoma cancer cell.]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2008;11(6):765-768.

90. Zheng R, Qin X, Li W, Kang J. [Effect of Src tyrosine kinase inhibition on secretion of MMP-2 and MMP-9 by non-small cell lung cancer cells]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2011;14(1):13-17.
91. Zhang XF, Zhang Y, Zhang XH, Zhou SM, Yang GG, Wang OC, et al. Clinical significance of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) expression in primary rectal cancer. *BMC cancer*. 2009;9:134.
92. Hu L, Hittelman W, Lu T, Ji P, Arlinghaus R, Shmulevich I, et al. NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009;89(5):531-548.
93. Buss JL, Greene BT, Turner J, Torti FM, Torti SV. Iron chelators in cancer chemotherapy. *Current topics in medicinal chemistry*. 2004;4(15):1623-1635.
94. Jones DT, Trowbridge IS, Harris AL. Effects of transferrin receptor blockade on cancer cell proliferation and hypoxia-inducible factor function and their differential regulation by ascorbate. *Cancer research*. 2006;66(5):2749-2756.