



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO DE UN MODELO DE
DETECCIÓN MÚLTIPLE DE CITOCINAS
ASOCIADO AL PRONÓSTICO Y
SUPERVIVENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN
POR MINERÍA DE DATOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
EDGAR MONTES SERVÍN.

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ.

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA INTEGRATIVA.
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS".



2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales




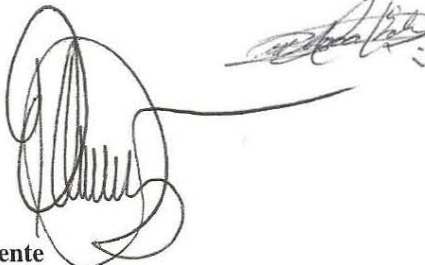
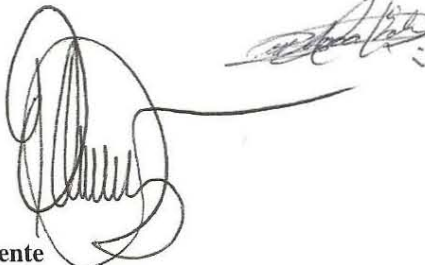
Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Desarrollo de un modelo de detección múltiple de citocinas asociado al pronóstico y supervivencia de cáncer de pulmón por minería de datos.

realizado por **Montes Servín Edgar** con número de cuenta **3-0722583-0** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra. Allete Ortega Gómez	
Propietario	Dr. José Luis Arreola Ramírez	
Propietario Tutora	Dra. Lourdes María Barrera Ramírez	
Suplente	Dra. Blanca Edith Millán Chiu	
Suplente	M. en C. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”
 Ciudad Universitaria, D. F., a 13 de marzo de 2014
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm



AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios.

A la Licenciatura en Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A BD Biosciences por su aportación de reactivos para el desarrollo del proyecto.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y al Laboratorio de Inmunología Integrativa a cargo de la Dra. Isabel Sada Ovalle.

A mi tutora Dra. Lourdes Barrera Ramírez por la dirección y apoyo en mis estudios de licenciatura.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mi madre: María de la Luz Servín Natividad con todo mi cariño y mi amor porque siempre has hecho todo, lo posible y lo imposible para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y por apoyarme en todo momento, por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi padre: Francisco Montes Vázquez por su invaluable apoyo y comprensión a lo largo de todos mis estudios.

A mi hermana: Elizabeth Montes Servín, aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por tu paciencia y apoyo.

A mis abuelos: Francisco Montes, Manuela Vázquez, Romelia Natividad y en especial a José Luis Servín Islas, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Gracias por enseñarme a ser una persona honesta, trabajadora y un líder.

A mis profesores: A mis maestros que influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida.

A mis amigos: María Fernanda Salinas Parra, Maira Maldonado Hernández, Miguel Ángel García Vera y José Luis Bañales Méndez. Porque ustedes me acompañaron a lo largo de este proceso estuvieron pendientes de que todas las cosas me salieran bien y de que no tomara una mala decisión, les agradezco la confianza que depositaron en mí para poder estar siempre en las buenas y las malas juntos. Gracias por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca voy a olvidar.

Esta tesis es el resultado de lo que todos me han enseñado, es por ello que les dedico este trabajo de tesis.

Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

ÍNDICE.

I.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
II.	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
III.	RESUMEN.....	10
IV.	INTRODUCCIÓN.....	11
V.	ANTECEDENTES.....	14
1.1.	Pensamiento sistémico.....	14
1.2.	Teoría General de Sistemas: Las leyes del todo integrado.....	17
1.3.	Sistemas complejos.....	19
	Sistemas Biológicos Complejos.....	21
	Interpretación y aplicación clínica.....	29
1.4.	Sistema Inmune como sistema biológico Complejo.....	31
1.5.	Regulación de sistema inmune sistémico.....	33
	Regulación por Linfocitos.....	33
	Regulación Genética.....	35
	Regulación neuroendocrina.....	35
1.6.	La complejidad del sistema inmune.....	36
1.7.	El cáncer como un sistema biológico complejo.....	37
	Síndrome disfuncional multisistémico.....	38
1.8.	Arquitectura de redes biológicas.....	40
	Redes de interacción de proteínas.....	43
	Citocinas.....	44
	Las citocinas y el desarrollo del cáncer.....	44
	Papel de las citocinas en las respuestas inflamatorias e inmunes.....	46
VI.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
VII.	HIPÓTESIS.....	49
VIII.	OBJETIVOS.....	50
	Objetivo General.....	50
	Objetivo específicos.....	50
IX.	MÉTODOS.....	51
	Diseño del estudio.....	51
	Metodología experimental.....	53
X.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56

Diseño estadístico del estudio	56
XI. RESULTADOS.	59
Los pacientes y sujetos de control.	59
Niveles de citocinas en los pacientes y sujetos de control.	59
Asociación de los niveles de citocinas con características clínicas y análisis de laboratorio.....	59
Sobrevida Global de la citocinas y las características clínico-patológicas.....	60
Clúster de citocinas mediante el análisis de minería de datos.....	60
Sobrevida Global de los Clusters de minería de datos.	60
XII. DISCUSIÓN.	77
XIII. CONCLUSIONES.....	80
XIV. REFERENCIAS.	81
XV. ANEXO.	87

I. LISTA DE ABREVIATURAS.

CP	Cáncer Pulmonar
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1-Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12P70	Interleucina 12 P70
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IL-2	Interleucina 2
IFN-γ	Interferón gamma
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
IL-27	Interleucina 27
IL-29	Interleucina 29
IL-31	Interleucina 31
IL-33	Interleucina 33
CBA	Cytometric Bead Array
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Expectation Maximization
SG	Sobrevida Global
IMC	Índice de Masa Corporal
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
TGS	Teoría General de Sistemas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Célula Asesina Natural
Tc	Célula T citotóxica
Th	Célula T cooperadora

II.LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

- FIGURA 1. MAPA MENTAL DEL PENSAMIENTO SISTÉMICO, EL PENSAMIENTO SISTÉMICO ES EL QUE SE DA EN UN SISTEMA DE VARIOS SUBSISTEMAS O ELEMENTOS INTERRELACIONADOS. INTENTA COMPRENDER SU FUNCIONAMIENTO Y RESOLVER LOS PROBLEMAS QUE PRESENTAN SUS PROPIEDADES. EL PENSAMIENTO SISTÉMICO FACILITA LA CLARIDAD Y MODIFICACIÓN DE PATRONES. 14
- FIGURA 2. "TEORÍA GENERAL DE LOS SISTEMAS" L. V. BERTALANFFY..... 15
- FIGURA 3. HOLARQUÍAS Y EL ORDEN DE LA NATURALEZA: ESTRUCTURAS JERÁRQUICAS / UNIDADES DE VIDA QUE CONDUCEN A LA COMPLEJIZACIÓN DE ORDEN ORGANIZATIVO. LA NOCIÓN DE ENTIDADES QUE SON TOTALIDADES "INDEPENDIENTES" Y PARTES "DEPENDIENTES" QUE SE VEN COMO UNA ASIMILACIÓN GENERAL DE ORDEN INFERIOR EN EL NIVEL CONTIGUO. LOS NIVELES GLOBALES DE JERARQUÍAS CONTINUAS E INTERCONECTADAS E INTERDEPENDIENTE SUGIEREN UNA PERSPECTIVA INTEGRADA DEL PENSAMIENTO. LAS RELACIONES CAUSALES ENTRE LAS PARTES (ES DECIR, MECANICISTA, REDUCCIONISTA, ATOMISTA) Y EL TODO (ES DECIR, ORGANICISTA, SISTÉMICA, ECOLÓGICA) SE REPRESENTA MEDIANTE FLECHAS. (ILUSTRACIONES MODIFICADAS DE M. CLEMENS.)..... 18
- FIGURA 4. TIPOS DE SISTEMAS CON RESPECTO A LOS MÉTODOS DE ESTUDIO Y CLASIFICACIÓN DE SU COMPLEJIDAD, DADO POR WEINBERG (11). REPRESENTACIÓN CONCEPTUAL Y VISIÓN DE LOS SISTEMAS GENERALIZADOS DE LA "COMPLEJIDAD ORGANIZADA". TENIENDO EN CUENTA LA CLASIFICACIÓN Y ASOCIACIÓN ENTRE LA INCERTIDUMBRE Y LA COMPLEJIDAD (11) Y SU INTERACCIÓN MUTUA EN LA DEFINICIÓN DE LOS RANGOS DE LOS SISTEMAS. 22
- FIGURA 5. LAS EMERGENCIA DE LOS SISTEMAS VIVOS DEPENDE DE LAS CONEXIONES ENTRE SUS PARTES INTEGRANTES, LAS CUALES SON DINÁMICAS Y FLUIDAS, Y DEPENDEN DEL MOMENTO Y ENTORNO, DEBIDO A ELLO PODEMOS OBTENER ENTIDADES BIOLÓGICAS DIFERENTES Y DIVERSAS AL PRESENTAR ÉSTAS CONEXIONES Y DINÁMICA DE CONEXIÓN DIFERENTES ENTRE LAS PARTES QUE LAS FORMAN... 24
- FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ABSTRACTA Y SÍNTESIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS "SISTEMAS BIOLÓGICOS COMPLEJOS", INCLUYENDO SUS ENTIDADES CONSTITUTIVAS DE ORGANIZACIÓN JERÁRQUICAS (COMPONENTES/ ELEMENTOS) Y DE RELACIONES DINÁMICAS (FUNCIÓN EMERGENTE RELACIONAL). TENIENDO EN CUENTA QUE EL ORDEN Y COMPORTAMIENTO COMÚN PUEDEN SURGIR TANTO AUTO-ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURAS DE CONTROL. (MODIFICADO DE ILUSTRACIONES DE M. CLEMENS)..... 26
- FIGURA 7. LOS SISTEMAS COMPLEJOS SON AQUELLOS CON GRAN CANTIDAD DE VARIABLES Y CON COMPORTAMIENTOS IMPREDECIBLES..... 27
- FIGURA 8. SISTEMAS DE AUTO-ORGANIZACIÓN DE NIVELES BIOLÓGICOS. EL SISTEMA AUTO-ORGANIZADO SE VA CONSTRUYENDO COMO RESULTADO DEL INCREMENTO EN EL ORDEN ESPACIO-TEMPORAL FORMANDO DIFERENTES NIVELES, POR ESTRATOS, UNO POR ENCIMA DEL OTRO. 28
- FIGURA 9. EL CUERPO HUMANO ES UN SISTEMA BIOLÓGICO COMPLEJO, EL CUAL NO SOLO ES EL GENOMA QUE TENEMOS; SINO QUE TAMBIÉN ES INFLUENCIADO POR LOS ALIMENTOS QUE COMEMOS, TODO LO QUE HACEMOS Y A LOS QUE NOS EXPONEMOS A LO LARGO DE NUESTRA VIDA. ÉSTA HETEROGENEIDAD EN LAS CARACTERÍSTICAS DE CADA PERSONA ES LO QUE HACE QUE TODOS TENGAMOS UNA DISTINTA RESPUESTA A TRATAMIENTOS. 31
- FIGURA 10. FUNCIONES EFECTORAS DE LAS SUBPOBLACIONES Th1 Y Th2. MODIFICADO DE ABBAS Y COLABORADORES, 1996. 34
- FIGURA 11. RED DE COMUNICACIÓN TRI-DIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA INMUNE, EL SISTEMA NERVIOSO Y EL SISTEMA ENDOCRINO. 35

FIGURA 12. DE LOS PARTICULAR A LO UNIVERSAL. EL NIVEL 1 DE LA PIRÁMIDE NOS MUESTRAL UNA REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA CÉLULA: GENOMA, TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA. DENTRO DE LA CÉLULA LA ORGANIZACIÓN SE PUEDE OBTENER CONSIDERANDO LAS CONEXIONES ENTRE LOS COMPONENTES COMO RELACIONES FUNCIONALES, COMO MOTIVOS REGULADORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN METABÓLICAS (NIVEL 2), QUE SON LOS BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE LOS MÓDULOS OPERACIONALES (NIVEL 3), LOS CUALES SE VAN ANIDANDO Y GENERANDO UNA ARQUITECTURA HETERÁRQUICA LIBRE DE ESCALAS (NIVEL 4). LOS COMO PONENTES INDIVIDUALES SON ÚNICOS Y LAS PROPIEDADES TOPOLÓGICAS DE LAS REDES BIOLÓGICAS, COMPARTEN SIMILITUDES. LO QUE SUGIERE QUE EL UNIVERSO ESTÁ ORGANIZADO POR PRINCIPIOS QUE APLICAN A TODOS LOS TIPOS DE REDES COMPLEJAS..... 41

FIGURA 13. PAPEL QUE DESEMPEÑAN LA MAYOR PARTE DE LAS CITOCINAS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL. EL CÁNCER COEXISTE CON CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE COMO: MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES (TAM), CÉLULAS T- REGULATORIAS (TREG), CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs) Y CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MSCs). LOS TAM Y TREG SON LOS MAYORES PRECURSORES DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATORIAS T- COOPERADORAS 2 (Th2) COMO LOS SON: IL-4, IL-10, IL-13 Y TGF- β , LA CUAL SUPRIME LA INMUNIDAD ANTI-CANCERÍGENA. MEDIADO POR LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NK), LOS LINFOCITOS T CD8+ Y LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS COMO: IL-2, IFN- γ . EN UN AMBIENTE INMUNO-SUPRIMIDO SE PRODUCEN VARIAS CITOCINAS GENERADAS POR LAS CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA Y LAS CÉLULAS QUE CONFORMAN AL CÁNCER, LAS CUALES PROMUEVEN DIRECTAMENTE EL CRECIMIENTO TUMORAL. 45

FIGURA 14. PREHN FUÉ EL PRIMERO EN REPORTARA QUE FIRST REPORTED IN 1972 THAT IMMUNE CELLS PROMOTE TUMOUR GROWTH IN AN ANIMAL MODEL⁹, AND IT IS NOW ESTABLISHED THAT THE TUMOUR STROMA INCLUDES INFLAMMATORY CELLS, SUCH AS M2 MACROPHAGES, DENDRITIC CELLS AND T-REGULATORY LYMPHOCYTES¹⁰ (BOX 1), THAT PROMOTE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF CANCER. UNDER NORMAL CONDITIONS, AN INFLAMMATORY RESPONSE (BOX 1) IS REGULATED BY ACTIVE MECHANISMS. ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, SUCH AS INTERLEUKIN 10 (IL10) AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR B (TGFB), ARE IMPORTANT IN THIS PROCESS, AS ARE SOLUBLE RECEPTORS THAT NEUTRALIZE THE ACTIVITY OF CYTOKINES, SUCH AS SOLUBLE IL1 RECEPTOR TYPE II (IL1R2), AND CYTOKINE RECEPTOR ANTAGONISTS, SUCH AS IL1RA. 47

III. RESUMEN.

El cáncer de pulmón (CP) es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo; el cual puede entenderse como una alteración funcional sistémica del organismo. El cáncer se presenta con una enorme variabilidad en los patrones de severidad, estabilidad y duración en los ritmos fisiológicos, que están asociados a la enfermedad y pueden estar involucrados en su patogénesis. El estudio del cáncer se ha dirigido al campo de la detección temprana y predicción del avance de la enfermedad (biomarcadores), debido a que brindan información del curso y consecuencias de la enfermedad.

Se ha demostrado la presencia, importancia y correlación clínica de diversas citocinas individuales en CP. Sin embargo, no se han desarrollado modelos que permitan generar patrones pronósticos o de supervivencia de utilidad clínica que integren los valores de varias citocinas de manera simultánea. La minería de datos es una herramienta estadística avanzada para el análisis de las grandes bases de datos, generados por el estudio biológico del cáncer. Esta herramienta puede ser usada para descubrir patrones entre los datos, formando distintos grupos de pacientes en base a los distintos parámetros analizados. El análisis por minería de datos de las citocinas es una fuente altamente significativa y relevante de datos, que permite la clasificación y predicción de supervivencia de los pacientes, con el fin de poder discernir el significado de las diferencias en la variabilidad de los signos biológicos en diferentes grupos de pacientes.

El objetivo del proyecto fue cuantificar los valores absolutos de las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70; TNF, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17a, IL-27, IL-29, IL-31 e IL-33) secretadas a torrente sanguíneo, en 110 pacientes con CPCNP sin tratamiento previo y 25 sujetos sanos (control), mediante inmunoensayos de detección múltiple asociados a perlas por citometría de flujo Cytometric Bead Array (CBA por sus siglas en inglés) y kits de ELISA. Los resultados se analizaron por minería de datos con los algoritmos K-means, EM (Expectation-Maximization) y J48. El análisis arrojó 3 grupos de pacientes definidos por una serie de reglas, en patrones definidos que correlacionaron con la supervivencia global (SG) de los pacientes. Los pacientes del clúster 1, no alcanzaron la mediana de supervivencia, en tanto, los del clúster 2 y 3 presentaron una mediana de 16.9 meses [13.1-20.6] y 5.1 meses [0.9-9.2 meses] respectivamente con una $P=0.0012$. Por lo que este análisis permite por primera vez, proponer un patrón múltiple de citocinas que puede ser estandarizado y utilizado como criterio complementario de diagnóstico e inmunoterapia dirigida en pacientes con CP.

IV. INTRODUCCIÓN.

El estudio de la biología se ha basado en múltiples ocasiones sobre su metodología de estudio en planteamientos reduccionistas; lo cual ha conllevado a diversas consecuencias que impiden el entendimiento y el correcto estudio de las entidades y procesos biológicos. Ahora sabemos que las entidades biológicas son sistemas complejos, en los cuales el total no es igual que la suma de sus partes y las propiedades de un sistema son distintas de las de sus componentes. Aunque de ellas dependen de la integridad del todo, siendo que las propiedades sistémicas desaparecen cuando el sistema se rompe, como ocurre con alguna enfermedad [1].

Debemos de entender a las entidades biológicas, como sistemas complejos vivos. Que están compuestos por una serie de elementos que lo integran y que se encuentran altamente relacionados unos con otros; estableciendo un sistema de conexión en red. Dichas relaciones no deben ser entendidas como competencias, ni como cooperaciones, ya que estos son términos subjetivos, definidos por la propia racionalidad humana. Sino que deben ser entendidas como simples interconexiones que favorecen y promueven el correcto funcionamiento global de todos los módulos. Obteniéndose así una de las propiedades fundamentales. “Los sistemas complejos no son reducibles a las propiedades iniciales o de las partes integrantes”. Por tanto, el carácter principal del comportamiento del sistema es de tipo integrador.

Este carácter integrador permite la correcta integración de todas las partes constitutivas para conseguir el orden y la estabilidad final del sistema. Posee de hecho, un significado contrario al que establecemos por la denominación de carácter competitivo, el cual promueve las relaciones antagónicas ó de rivalidad entre las partes. Este tipo de relaciones son causantes de la pérdida de actividad o función de algunos de los de los módulos o elementos modulares constitutivos. Impidiendo así su correcta integración y produciendo la pérdida de estabilidad u orden sistémico [1]. Generando la desintegración de un sistema multinivel que puede producirse como consecuencia de la desregulación en el nivel de comunicación.

En base a esto, el crecimiento anormal de las células individuales (cáncer) podría ser el resultado de la pérdida de las cantidades óptimas de comunicación (excesiva, disminución e interrupción) entre los subsistemas en el mismo nivel o en una red celular [2].

La desorganización y el desorden en los sistemas biológicos, son manifestaciones de un fallo general del sistema y se encuentran en la raíz de un traumatismo agudo, las enfermedades y la senescencia. Esta observación debe ser entendida en el contexto de que el trastorno biológico es el fin de un trastorno funcional (y a la inversa). Desde el punto de vista termodinámico, si uno sigue el camino que conduce a la desorganización del sistema, el resultado es inevitable. Se alcanza el estado terminal (muerte) cuando se rompe o se llega a un desglose crítico en la red de señalización y conectividad, la cual interactúa a distintos niveles biológicos (órganos, tejidos, y procesos celulares). Por lo que los cambios en las redes reguladoras comprometen el funcionamiento general del sistema a tal grado que puede llevar a una muerte [3].

Debido a que las propiedades del sistema son resultado de las conexiones de sus partes (siendo estas propiedades difieren entre sí), cuando las propiedades del sistema son destruidas por la enfermedad (cuando el sistema es diseccionado en elementos aislados) el sistema cae. Por tanto, los sistemas complejos no son fragmentables y se caracterizan por ser irreducibles. Sus relaciones causa-efecto se encuentran ligadas a múltiples variables, es decir, un efecto puede no tener siempre una misma causa y una misma causa no tiene por qué dar lugar siempre a un mismo efecto [1].

El cáncer puede entenderse como una alteración funcional sistémica del organismo humano, y se presenta con una enorme variabilidad en los patrones de severidad, estabilidad y duración. Los sistemas biológicos complejos se caracterizan por presentar ritmos o ciclos medibles y objetivables. Los ritmos anormales están asociados a la enfermedad y pueden estar involucrados en su patogénesis, este fenómeno se denomina “enfermedad dinámica”, y se observa cuando la suma total es superior a la suma de sus partes [4]. La respuesta que monta el sistema inmune frente a una enfermedad como lo es el cáncer, es una respuesta sistémica biológica altamente compleja, tanto espacial como temporalmente, cimentada en una red dinámica de proteínas (citocinas) interconectadas, interdependientes, redundantes y pleiotrópicas [4].

Se conoce y se reconoce la asociación de las alteraciones de los ritmos fisiológicos con la presencia de enfermedad (cáncer), siendo que la medición de los valores absolutos de los parámetros clínicos (como la medición de moléculas secretadas al medio intracelular y torrente sanguíneo por las células tumorales y células del sistema inmune), son una fuente altamente significativa y relevante de datos sobre el estado de los pacientes, y que nos permiten hacer una predicción de la sobrevida de los pacientes [4].

Sin embargo, no hay estudios en los cuales evalúen varios analitos de manera simultánea en una muestra de sangre en pacientes con cáncer de pulmón; ya que la medición de la variabilidad de estos datos ofrece una muy valiosa información adicional conjuntándolo con una nueva herramienta estadística como la minería de datos. La cual nos ayuda a identificar y discernir las diferencias en la variabilidad de los signos biológicos en diferentes grupos de pacientes [4].

La identificación de distintos grupos sobre los pacientes se debe a que los sistemas biológicos están definidos por una serie de cualidades bien establecidas, debido a su complejidad y organización a múltiples escalas y niveles. Cada grupo está definido por un conjunto de reglas propias que los diferencian de raíz, cuando se comparan con sistemas que no poseen cierto atributo. Esto quiere decir que toda entidad biológica en su condición de sistema complejo vivo, expresa una serie de características únicas y diferenciales [1].

Por lo que la definición y evaluación de grupos de pacientes en base a un perfil específico de proteínas solubles detectables en sangre (citocinas), asociadas con las características clínico-patológicas de los pacientes y su asociación con la sobrevida global. Representa una importante herramienta para analizar la red de interacción de citocinas y así identificar subgrupos de pacientes con diferente pronóstico y también nuevos biomarcadores potenciales en las estrategias terapéuticas, en particular en el enfoque de la inmunoterapia.

V. ANTECEDENTES.

1.1. Pensamiento sistémico.

Hacia la segunda mitad del siglo XIX, surge el pensamiento sistémico. Especialmente entre los biólogos, lo que trajo como consecuencia, la reflexión sobre las relaciones entre las partes que componían un todo y la necesidad de reconocer que éste surgía como la expresión de esas relaciones y no podía ser explicado desde el entendimiento de sus partes. El pensamiento sistémico (Figura 1), holístico o integrador, se entiende como una forma de apreciar la realidad que complementa el enfoque reduccionista tradicional [5].

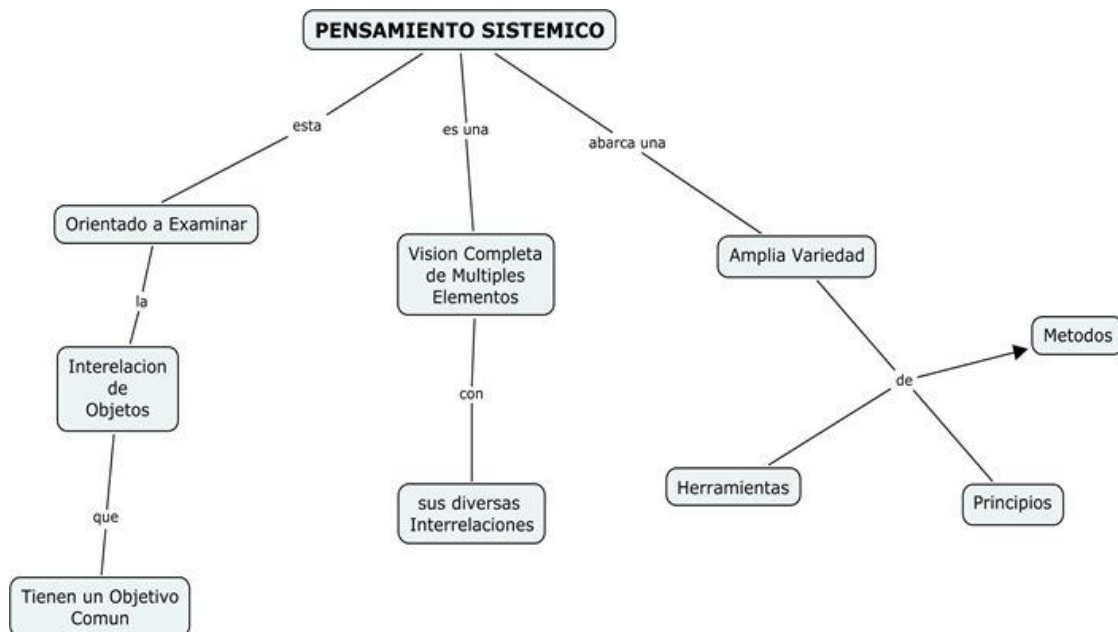


Figura 1. Mapa mental del pensamiento sistémico., El pensamiento sistémico es el que se da en un sistema de varios subsistemas o elementos interrelacionados. Intenta comprender su funcionamiento y resolver los problemas que presentan sus propiedades. El pensamiento sistémico facilita la claridad y modificación de patrones.

El enfoque reduccionista, constituye una buena estrategia de estudio para hacer frente a la complejidad de los sistemas, ya que el análisis fraccionado, partido o reducido, permite transformar nuestro objeto de estudio en algo más simple y accesible al entendimiento. Sin embargo, el peligro de este enfoque no está en la reducción, si no que se puede concluir erróneamente que las explicaciones obtenidas corresponden al objeto original; siendo que lo analizado ya no es igual a lo que teníamos originalmente [5].

Por otra parte la noción de un sistema compuesto por elementos interdependientes ha sido objeto de preocupación humana y de investigación durante siglos. El hombre ha explorado el sistema solar y las constelaciones desde la antigüedad. Nosotros, como especie, hemos luchado con el complicado conjunto de elementos interconectados que controlan nuestro mundo interno y externo. Por lo que no es nuevo la aplicación de los sistemas de pensamiento y los principios de la ciencia de los sistemas generales a los problemas en las ciencias de la vida [3].

En 1940 Ludwig von Bertalanffy inicia la construcción de una metadisciplina (teoría de teorías) que denominó “Teoría General de los Sistemas” (TGS) (Figura 2), una propuesta donde las matemáticas tienen un papel importante para el manejo de la relaciones entre las partes y las causalidades [5].

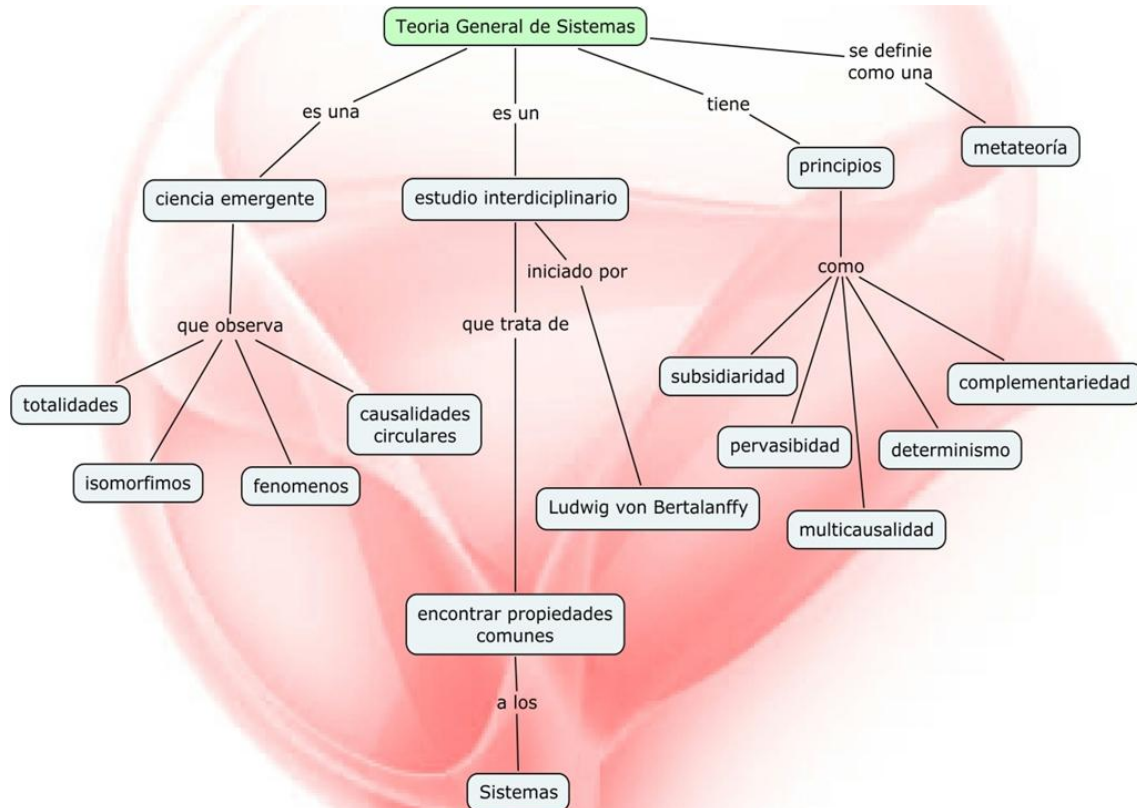


Figura 2. “Teoría general de los sistemas” L. V. Bertalanffy.

*El estudio transdisciplinario de la organización abstracta de los fenómenos,
independientemente de su sustancia,
tipo ó escala espacio-temporal de su existencia.
La investigación tanto de los principios comunes
A todas las operaciones de las entidades complejas,
y los modelos matemáticos (por lo general)
que se puede utilizar para describirlos.*

Un indicio de la ciencia de sistemas fue anticipado con el “Gestalten física”, una visión del mundo natural, publicado en la década de 1920 por Köhler. De acuerdo con el gran líder en el campo de la TGS, Ludwig von Bertalanffy, las ideas de Gestalten física fueron los precursores destinados a la elaboración de las propiedades más generales de los sistemas inorgánicos, en comparación con los sistemas orgánicos. Comparando los sistemas cerrados con sistemas inorgánicos y a los sistemas reales (abiertos) con los sistemas orgánicos (biológicos), que se comunican e intercambian energía (información) con el medio ambiente y por lo tanto tienen características de auto-organización, aprendizaje y adaptación [3].

La teoría de sistemas surge como una reacción a la reclusión de reduccionismo, motivado por un profundo deseo de restablecer la unidad de la ciencia. Por lo que algunos aspectos de la tradición intelectual y la historia científica son dignos de repetirse.

En los años de 1960, la teoría y la biología de sistemas atrajeron el interés de muchos biólogos, cibernéticos, matemáticos e ingenieros. Los nuevos datos cuantitativos (genoma, proteoma, physioma) incitados por los avances de la biología molecular y celular, despertaron el interés y el redescubrimiento de las técnicas formales de construcción de modelos; una de las múltiples perspectivas que se presentaron es la re-encarnación de la teoría general de sistemas organicistas que sirvió como un impulso para sugerir que la complejidad organizada puede ser entendida. Debido a que la capacidad de conocer todos los componentes de un sistema, así como todas sus relaciones; nos permite entonces predecir completamente el comportamiento de sistema [3].

En la introducción a su obra fundamental, Teoría general del sistema [6], Ludwig von Bertalanffy, escribió en 1967 que el concepto de sistemas había permeado en todos los campos de la ciencia, así como el pensamiento popular, la jerga, y medios de comunicación. Siendo así que el lenguaje común continúa incluyendo conceptos como la adaptación, el control, la diferenciación, el comportamiento dinámico, la jerarquía, la robustez, fiabilidad y sensibilidad.

1.2. Teoría General de Sistemas: Las leyes del todo integrado.

Von Bertalanffy desarrolló los principios de la teoría de sistemas a finales de 1920 [6]. La teoría llamó la atención sobre una nueva perspectiva ó método, que él llamó "la biología organicista", que asigna una dinámica de auto-organización a los sistemas biológicos. Para ello desarrolló la teoría cinética de los sistemas abiertos, que se caracteriza por equifinalidad o el estado de equilibrio [3].

Su principal objetivo era unir el metabolismo, el crecimiento, la morfogénesis y la fisiología, en una teoría dinámica de los sistemas abiertos estacionarios; un intento de explicación, que nombró de "La Teoría de sistemas del organismo". No fue, sino hasta la década de 1940 que reconoció que "no existen modelos, principios y leyes que se apliquen a sistemas generalizados o a sus subclases, independientemente de su tipo particular, la naturaleza de los elementos que lo componen, así como las relaciones o "fuerzas" entre ellos [3].

Este concepto de la gran unificación fue criticada como pseudociencia y fue un primer intento de conectar las cosas de manera integral. Tales críticas se han disipado con el reconocimiento de que TGS es más que una perspectiva o paradigma, y que estos marcos conceptuales básicos son fundamentales para el desarrollo de la teoría científica exacta y una nueva manera de hacer ciencia. La TGS no estaba destinada a ser una sola teoría general. Por encima de todo, es un sistema de teorías, se ocupa de los fenómenos, organismos sistémicos y grupos (por ejemplo, las naciones, las economías, la biosfera, universo). Se considera a un sistema como un todo integrado de sus componentes subsidiarios, no un agregado mecánico de piezas en que las relaciones causales son aislables [7].

La ciencia de los sistemas no se limita a un nivel particular de orden biológico o conjunto de relaciones. Esta perspectiva de todo incluido, nos permite mirar a una red de genes o células como un sistema integrado, conformando un órgano, un organismo, etc. formando un sistema organizado por jerarquías (Figura 3).

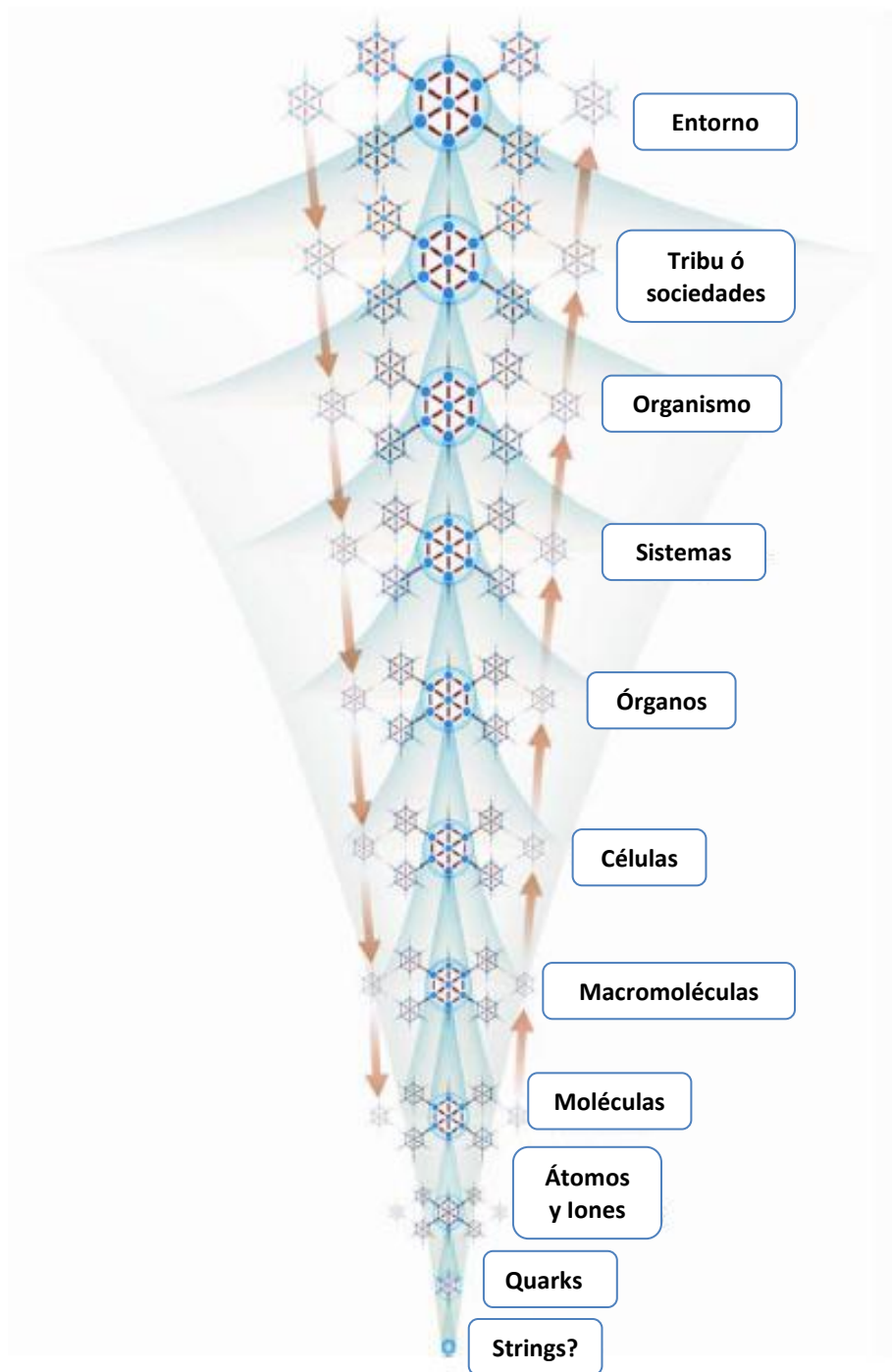


Figura 3. Holarquías y el orden de la naturaleza: estructuras jerárquicas / unidades de vida que conducen a la complejización de orden organizativo. La noción de entidades que son totalidades "independientes" y partes "dependientes" que se ven como una asimilación general de orden inferior en el nivel contiguo. Los niveles globales de jerarquías continuas e interconectadas e interdependiente sugieren una perspectiva integrada del pensamiento. Las relaciones causales entre las partes (es decir, mecanicista, reduccionista, atomista) y el todo (es decir, organicista, sistémica, ecológica) se representa mediante flechas. (Ilustraciones modificadas de M. Clemens.)

Las interacciones a múltiples niveles de la red de reacciones en los sistemas vivos dinámicos, son una de las características esenciales de los sistemas vivos, cuyos componentes están sometidos a crecimiento, desarrollo y diferenciación; los cuales demuestran la existencia de una teoría general de sistemas. Que se ocupa de las características formales de los sistemas, los hechos concretos que aparecen como sus aplicaciones especiales mediante la definición de las variables y parámetros [8].

1.3. Sistemas complejos.

En la última década se ha producido, en prácticamente todos los campos del quehacer científico, una importante transformación conceptual y metodológica íntimamente ligada al estudio de los llamados fenómenos no-lineales cuyo análisis se engloba, parcialmente, dentro de las llamadas ciencias de la complejidad o de los sistemas complejos. Como parte de esta nueva visión, se ha mostrado que diversas propiedades espacio temporales de los sistemas complejos surgen espontáneamente a partir de interacciones entre los elementos constituyentes, en escalas de tiempo y longitud considerablemente mayores que las escalas en las que ocurren dichas interacciones. Estas propiedades, llamadas propiedades emergentes, han comenzado a ser estudiadas con un conjunto de herramientas nuevas y conceptos originados en la interacción interdisciplinaria de varios campos de la ciencia, desde la física, la biología, la química, la economía, la sociología y las matemáticas, por mencionar algunas [9].

Los sistemas complejos están formados por un conjunto grande de componentes individuales que interactúan entre sí y que pueden modificar sus estados internos como producto de tales interacciones. En la naturaleza existe un sinnúmero de ejemplos de sistemas complejos que van desde las reacciones químicas autocatalíticas, hasta los procesos socioculturales. La naturaleza posee una fuerte tendencia a estructurarse en forma de entes discretos que interactúan y que se organizan en niveles jerárquicos de creciente complejidad, por ello, los sistemas complejos de ninguna manera casos raros ni curiosidades, sino que dominan la estructura y función del universo. Constituyen y se manifiestan en la inmensa mayoría de los fenómenos observables. Sin embargo, una de las propiedades más interesantes de la abundancia y diversidad de los sistemas complejos (sean de tipo físicos, químicos, biológicos, sociales, etc.) es que no implica una innumerable e inclasificable diversidad de conductas dinámicas diferentes. Si no todo lo

contrario, los sistemas complejos poseen propiedades genéricas, independientemente de los detalles específicos de cada sistema o de la base material del mismo [10].

La aportación fundamental de la ciencia de los sistemas complejos es la tarea de conocer y transformar nuestra realidad, es identificar los principios y fundamentos generales de la operación de dichos sistemas sin importar los detalles particulares de su realización material. En la biología, al analizar los objetos vivientes (o comportamiento), observamos que poseen atributos funcionales de los componentes y procesos bioquímicos, estos se organizan de forma jerárquica para mantener la integridad, el desarrollo y la progresión del sistema en cuestión [3].

Un buen ejemplo de la complejidad organizada (la superposición de sistema al sistema) es el sistema inmune humano, que se compone de cerca de un billón de células y señales de los productos químicos que regulan con exquisita precisión los patógenos innumerables que recorren el cuerpo. Las partes del sistema inmune actúan sin un organizador central (aunque las señales del cerebro pueden modular su acción) para controlar el plan de acción detallado [3].

Claramente, los procesos orgánicos están clasificados deliberadamente para mantener y preservar la integridad del sistema. En contraste, los procesos fisicoquímicos que ocurren en un organismo que ha sido alterado (por enfermedad, condición patológica) todavía siguen las leyes convencionales de la física pero difieren profundamente en términos de principios de organización relacional y el orden del sistema identificable normal (sano).

Debido a esto, la información de un sistema (comportamiento colectivo) es mayor que la suma de la información acerca de las partes, es decir, es el eslabón que falta en el reduccionismo penetrante que practica hoy en día. Lo que es especialmente necesario es un cuadro coherente de cómo se utiliza esta información para llevar a cabo las funciones biológicas [3].

Sistemas Biológicos Complejos.

Los sistemas vivos están organizados de tal manera que manifiestan características operativas atribuidas a las estructuras jerárquicas y heterárquicas. La organización funcional es inherentemente de una heterarquía de interrelaciones y, como tal, no tiene rango obvio o fijo. A diferencia de las máquinas o mecanismos, la jerarquía funcional no determina el nivel y la importancia de cooperatividad [3].

Las reglas básicas de la cooperación distribuida (es decir, superposición de sistema al sistema) se inspiran en preceptos de holarquía, definidos [11] como una organización jerárquica de entidades auto-reguladas (holones) que funcionan como totalidades autónomas supra-ordinados de sus partes y como las partes que dependen de la subordinación a los controles de los niveles superiores que definen su función. Esta perspectiva de superposición implica que los sistemas naturales se organizan de tal manera que cada nivel de sistema (Figura 3) está limitado por el siguiente nivel inmediatamente por encima de él y de manera similar por el nivel de apoyo por debajo. Esta disposición, en coordinación con el entorno local, promueve la estabilidad, robustez, y la adaptación [3].

La evolución parece favorecer el diseño del edificio de orden jerárquico. Las aparentes ventajas de una pirámide de varios niveles (Figura 4), con los sistemas simples en la parte inferior y los más complejos en la parte superior, son las interfaces y los vínculos que se crean por los intermedios. La naturaleza de estos subsistemas es dualista: se comportan como la integración de las totalidades a sus respectivas partes y como partes en sus respectivos conjuntos de alto nivel. El beneficio jerárquico de los sistemas organizado es inherente a esta modularidad, por lo que la descomposición del sistema en sus partes subsidiarias no arruinaría o desequilibraría la totalidad de la organización evolutiva. Herbert Simon [12] demostró matemáticamente que los sistemas complejos evolucionan a partir de los sistemas simples con mayor rapidez si existen formas intermedias estables, que si no lo hacen. Por lo tanto, la evolución mantiene los (sub) sistemas biológicos conservados y vigilados, haciéndolos resistentes a la incertidumbre del entorno local y al fracaso de los conjuntos de componentes [3].

Clasificación la complejidad

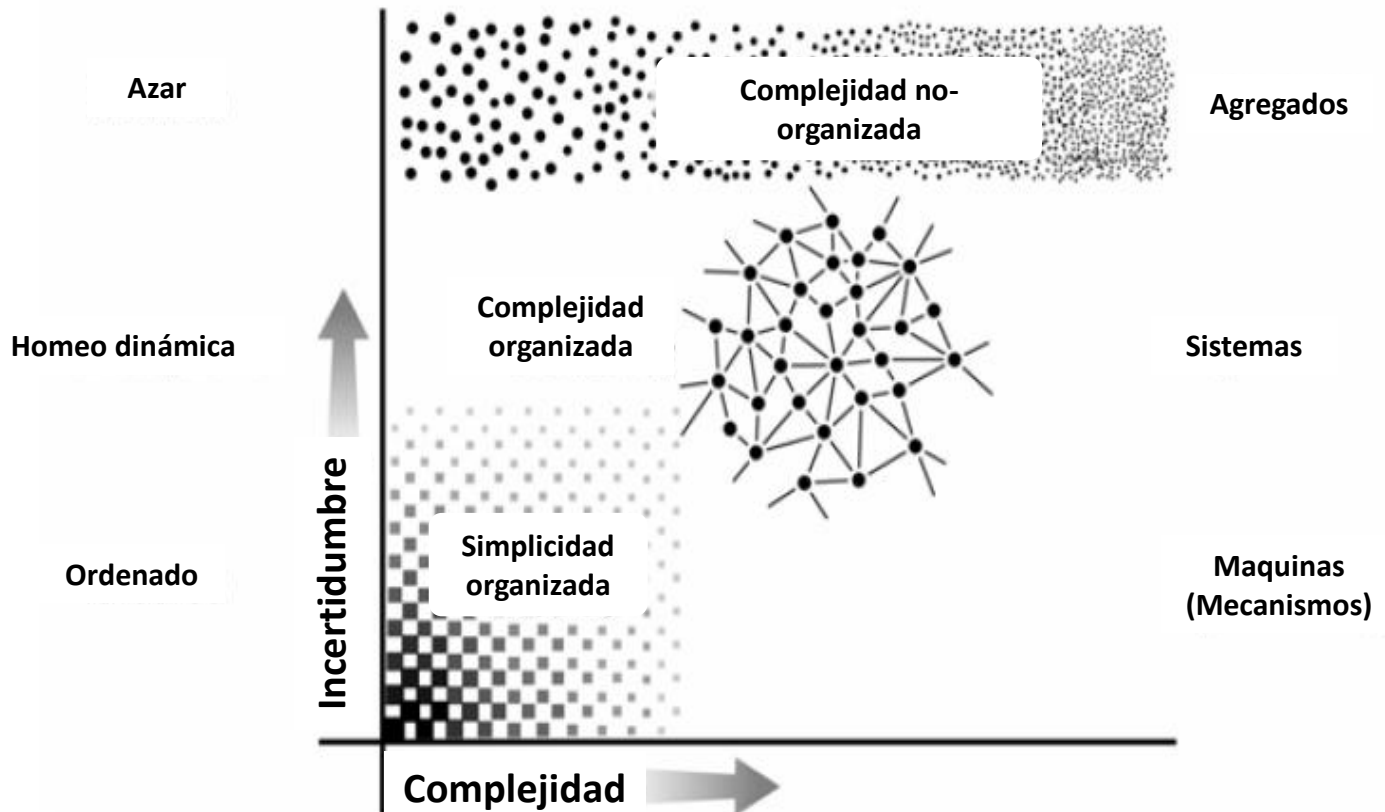


Figura 4. Tipos de sistemas con respecto a los métodos de estudio y clasificación de su complejidad, dado por Weinberg (11). Representación conceptual y visión de los sistemas generalizados de la "complejidad organizada". Teniendo en cuenta la clasificación y asociación entre la incertidumbre y la complejidad (11) y su interacción mutua en la definición de los rangos de los sistemas.

Los sistemas complejos vivos o biológicos, debido a su ontología compleja poseen una serie de atributos o características que los diferencian de cualquier sistema simple ó meramente complicado (Figura 7). Las propiedades sistémicas, por tanto, son destruidas cuando el sistema es diseccionado en elementos aislados. Por tanto los sistemas complejos no son fragmentables y se caracterizan por ser irreducibles. Sus relaciones causa-efecto se encuentran ligadas a múltiples variables, es decir, un efecto puede no siempre tener una misma causa y una misma causa no tiene por qué dar lugar siempre a un mismo efecto. A su vez, los sistemas complejos no son computables y no los podemos fabricar de forma artificial [1].

Así, los sistemas biológicos vienen definidos por una serie de cualidades bien establecidas, su complejidad y organización a múltiples escalas y niveles, cada uno de ellos marcados por un conjunto de reglas propias, los hace diferentes de raíz frente a sistemas que no poseen este atributo. Además, se distinguen de otros sistemas complejos físicos no vivos en sus cualidades de adaptación, crecimiento y desarrollo, reproducción y evolución. Esto quiere decir que toda entidad biológica en su condición de sistema complejo vivo, expresa una serie de características únicas y diferenciales. Toda entidad biológica proviene de otra parental más o menos semejante de la que desciende, y además es capaz de reproducirse para formar nueva descendencia. A su vez, los sistemas vivos son capaces de adaptarse a las variaciones que puedan desplazarlos de su equilibrio, y dan nuevos tipos de organismos mediante la evolución [1].

Al analizar la emergencia o comportamiento emergente en los sistemas biológicos, somos capaces de resaltar una serie de propiedades que los hacen únicos, la principal de ellas es la vida, es decir, el estar ó más bien ser vivos. Estas propiedades emergentes no corresponden con ninguno de las de sus componentes. La emergencia por tanto es lo que las partes integrantes del sistema llevan a cabo juntas y que no harían al encontrarse separadas, es decir, es un comportamiento colectivo, resultante de la interacción del sistema con el ambiente y que no haría por sí mismo al no existir esta interacción (Figura 5). Debido a la emergencia obtenemos los atributos previamente citados que definen a los sistemas biológicos, como son la auto-organización, el auto-ensamblaje, la auto-reparación, y la auto-replicación o reproducción [1].

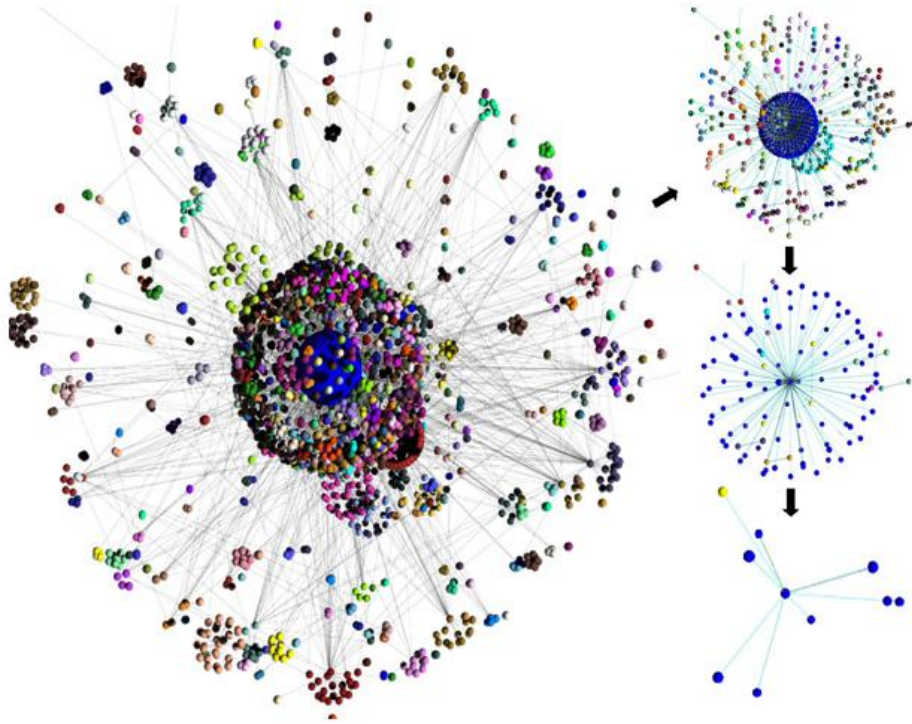


Figura 5. Las emergencia de los sistemas vivos depende de las conexiones entre sus partes integrantes, las cuales son dinámicas y fluidas, y dependen del momento y entorno, debido a ello podemos obtener entidades biológicas diferentes y diversas al presentar éstas conexiones y dinámica de conexión diferentes entre las partes que las forman.

Los sistemas biológicos son capaces de mantener su estado y función frente a perturbaciones tanto externas como internas, dependiendo de su condición de adaptabilidad. Cuanto más complejo es un organismo, más fina es la regulación de sus procesos, y por consiguiente son más robustos, tolerando los pequeños cambios.

La robustez tiene importantes implicaciones evolutivas, ya que es capaz de amortiguar pequeños cambios en los procesos de evolución de un organismo. Mediado a través de cambios bruscos que impliquen una reorganización considerable, y no mediante pequeñas mutaciones azarosas y graduales, como tradicionalmente ha sido defendido. La complejidad viene emparentada con el surgimiento de comportamientos y propiedades emergentes, lo cual influye a su vez en la robustez al aparecer las propiedades que permiten al sistema organizarse desde dentro. Todo sistema robusto es a su vez frágil. Si bien es robusto frente a incertidumbres comunes debido a su diseño y capacidad de adaptación. Pero frente a incertidumbres en las que el sistema haya evolucionado, el sistema es frágil y puede producirse la muerte [1].

Determinadas conexiones que conforman el sistema poseen un carácter esencial y si son perturbadas puede generar la disfunción y posible destrucción del sistema. Este es el caso de los genes esenciales que suelen constituir entre el 5 o el 10% de los genes totales de los organismos vivos, o el núcleo metabólico celular. Cuando estos elementos son alterados y si el organismo no muere, puede producirse un cambio evolutivo de considerable magnitud y relevancia [1].

La robustez en los sistemas biológicos se debe a la existencia de redundancia tanto estructural como funcional, es decir unos elementos o interacciones pueden ser sustituidos en un momento dado por otros. La robustez es debida también a los fenómenos de autorregulación y autobalance de los procesos bioquímicos, apareciendo procesos del tipo feedback positivo y negativo entre los distintos elementos que disponen conexiones al relacionarse en una estructura de red. Influyendo de manera determinante en la robustez los sistemas de prevención, reducción y corrección de errores. Permitiendo reparar los productos, si no es posible su reparación o si poseen un carácter tóxico para el organismo, mediante métodos de eliminación o desintoxicación [1].

Todo sistema biológico además de ser robusto y poseer una serie de propiedades emergentes que los caracterizan, es un sistema autopoyético. Esto implica la posesión de capacidad auto-organizativa y de auto-catálisis que aportan a los sistemas biológicos un orden anti-entrópico. Este orden es propio de los sistemas complejos vivos, deriva de su estructura interna como materia y se sirve de los procesos de feedback positivo y negativo que además aportan adaptabilidad al sistema. Este orden o patrón surge del propio sistema y es inherente a él, es una propiedad emergente, y no es impuesto por el entorno. El patrón alcanzado a nivel sistémico surge de la interacción de los elementos integrantes (Figura 6). Así, las interacciones sencillas y localmente establecidas entre estos elementos que no poseen información sistémica, proporcionan en su conjunto el patrón global del sistema [1].

Características de los Sistemas Biológicos Complejos

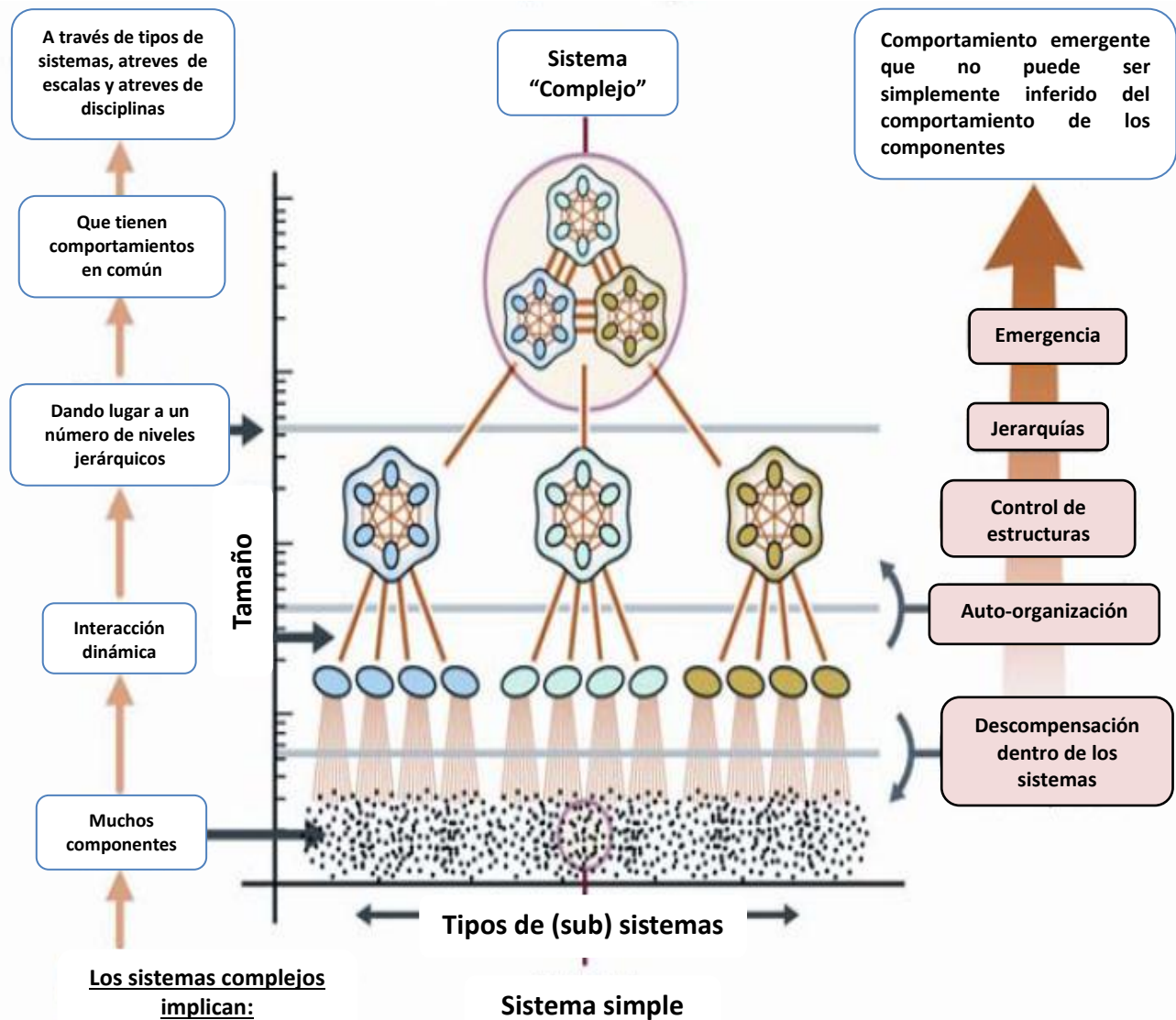


Figura 6. Representación abstracta y síntesis de las características de los "sistemas biológicos complejos", incluyendo sus entidades constitutivas de organización jerárquicas (componentes/ elementos) y de relaciones dinámicas (función emergente relacional). Teniendo en cuenta que el orden y comportamiento común pueden surgir tanto auto-organización y estructuras de control. (Modificado de Ilustraciones de M. Clemens).

De este modo podemos explicar un desarrollo generacionista o epigénico, en el cual mediante el uso de unas moléculas informacionales se crea un patrón de orden capaz de constituir un organismo complejo a partir de una masa informe. Y si bien el patrón es auto-organizado influye en él, el contexto en el cual se sucede. La creación y mantenimiento de interacciones entre los distintos elementos depende del contexto y de la información local.

Si eliminamos una fuente local de información no obtenemos el mismo orden final, y si variamos el contexto en el cual un elemento interactúa se pueden dar lugar a patrones de orden finales completamente diferentes [1].

En un esfuerzo por comprender los fenómenos biológicos complejos, se ha considerado a la teoría del caos y a la entropía como posibles modelos explicativos subyacentes (Figura 7) [4].

Complejidad y Caos

Comportamientos

		Impredecibles	Predecibles
		Número de Variables	Muchas Sistema Complejo: La relaciones de causa y efecto no se repiten y son impredecibles
	Pocas	Sistema caótico: No puede percibirse que haya relaciones de causa y efecto	Sistema Simple: La relación causa/efecto es repetible y predecible

Caos: Cuán complejos pueden ser los comportamientos de sistemas relativamente simples. Son sistemas no lineales que dan lugar a comportamientos erráticos.

Complejidad: Se busca encontrar el comportamiento simple de sistemas muy intrincados. Están a mitad de camino entre el orden y el desorden ("en el borde del caos").

Figura 7. Los sistemas complejos son aquellos con gran cantidad de variables y con comportamientos impredecibles.

La entropía¹ es el grado de desorden y de caos² que existen en la naturaleza. Es el segundo principio de la termodinámica que puede definirse como el "Proceso para la destrucción" ó "El desorden inherente a un sistema". Este principio establece que a cada instante el universo se hace más desordenado, donde hay un deterioro general inevitable hacia el caos. Por lo que el orden y el desorden se necesitan uno al otro, produciéndose mutuamente; siendo conceptos antagónicos, pero, al mismo tiempo, complementarios [13].

¹ Clausius, Rudolf Emmanuel (1865). Introduce la entropía como la formulación matemática de la segunda ley de la termodinámica, definida como donde SA es el valor (arbitrario) que asignamos a la entropía del estado de referencia A, T es la temperatura absoluta y dqrev es el calor intercambiado en un proceso irreversible ideal. Entropía es una función de estado.

² De acuerdo con el lenguaje de la termodinámica, el caos resulta de una ausencia de orden. El caos es la nada y significa la máxima indiferenciación de un sistema. (Cesarman: 1982).

En ciertos casos, un poco de desorden posibilita un orden diferente y, a veces, más rico. Así, por ejemplo, un organismo puede seguir viviendo a causa de la muerte de sus células; o una organización se perpetúa gracias a la desvinculación de sus miembros.

Los sistemas complejos pueden situarse en regímenes críticos caracterizados por la presencia de fluctuaciones espaciales y temporales en todas las escalas posibles. Esta situación de criticalidad puede alcanzarse de manera espontánea y sin la intervención de factores o fuerzas externas al sistema, se habla entonces de un proceso auto-organizado [14].

La auto-organización es la forma a través de la cual el sistema recupera el equilibrio, modificándose y adaptándose al entorno que lo rodea y contiene. En esta clase de fenómenos es fundamental la idea de niveles. Las interrelaciones entre los elementos de un nivel originan nuevos tipos de elementos en otro nivel, los cuales se comportan de una manera muy diferente [15] (Figura 8).

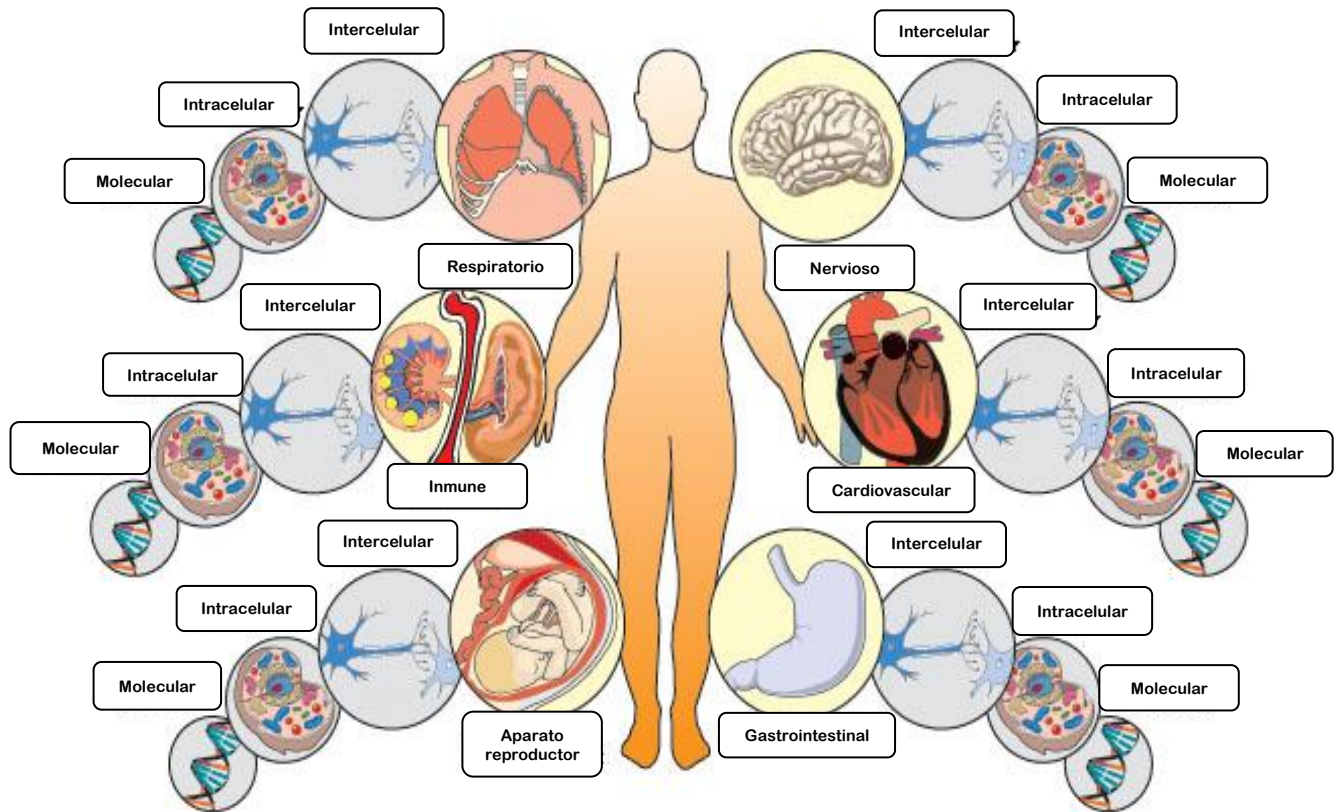


Figura 8. Sistemas de auto-organización de niveles biológicos. El sistema auto-organizado se va construyendo como resultado del incremento en el orden espacio-temporal formando diferentes niveles, por estratos, uno por encima del otro.

Los sistemas auto-organizados se mantienen dentro del estrecho dominio que oscila entre el orden inmutable y el desorden total, entre la constancia rígida y la turbulencia anárquica. Una condición muy especial, con suficiente orden para poder desarrollar procesos y evitar la extinción pero con una cierta dosis de desorden como para ser capaz de adaptarse a situaciones novedosas y evolucionar [16].

Los procesos de auto-organización son procesos de interacciones que pueden generar comportamientos colectivos y globales, es decir, conductas que no se definen en base a los elementos individuales; pero que emergen como un proceso colectivo y que no pueden ser reducidas ni explicadas tomando aisladamente a los elementos constituyentes [10].

Interpretación y aplicación clínica.

La adquisición de datos y métodos de análisis para la integración del todo en el organismo sigue siendo una tarea importante de la biología de sistemas. Es importante destacar que la comprensión cuantitativa de la totalidad de los sistemas subcelulares, celulares o multicelulares, alteraría radicalmente el enfoque y curso de descubrimiento de fármacos y la medicina personalizada [3].

En cuanto a las relaciones entre los niveles en la gran jerarquía heterarquía de orden viviente, los investigadores han expresado su interés en la simulación de sistemas biológicos, es decir, de abajo hacia arriba, comenzando con los genes y moléculas de proteínas, o de arriba hacia abajo, comenzando con fisiológica a gran escala. Modeladores notables abogan por una solución de compromiso, trabajo en ambas direcciones desde el centro (enfoque middle-out) [16].

Aunque no es posible analizar matemáticamente la evolución de muchos de estos sistemas, es posible explorarlos a través de experimentos numéricos (con sistemas informáticos) en los cuales se emplean potentes sistemas computacionales en donde se simulan sus componentes, sus conexiones y sus interacciones, observándose la dinámica emergente [3].

Para poder analizar estos parámetros en términos probabilísticos, se han desarrollado una serie de fórmulas utilizando teoremas ergódicos (estudios matemático del comportamiento promedio de largo plazo de los sistemas dinámicos), basados en los

trabajos de Kolmogorov [17], Sinai [18] y Oseledets [19]. Estos análisis requieren de grandes series de datos que frecuentemente hacen muy difícil sino imposible su cálculo en términos prácticos. Pincus [20] quien formuló la teoría y el método para poder hacer factible el estudio estadístico de la regularidad, relacionó un índice de generación de la información con la entropía de Kolmogorov aplicado a pequeñas series de datos clínicos originados de sistemas complejos “ruidosos” para demostrar la existencia o inexistencia de caos y la no linealidad. Con esta metodología, creó una nueva herramienta para el análisis estadístico de series de datos denominada entropía aproximada (EnAp) [4].

La EnAp es una herramienta estadística de regularidad que cuantifica la impredecibilidad de las fluctuaciones en una serie de datos generada a través del tiempo. Intuitivamente se podría suponer que la presencia de un patrón repetitivo de las fluctuaciones de una serie la hace más predecible que otra serie de datos en que ese patrón se encuentra ausente. La EnAp refleja entonces la probabilidad de que un patrón “similar” de observaciones puede no ser seguido de observaciones adicionales similares. Una serie que contiene patrones de variabilidad con valores pequeños de EnAp es más predecible y menos caótica que una que arroja valores mayores [21].

La EnAp es una representación de la tasa de generación de nueva información dentro de un sistema biológico porque provee una medida del grado de irregularidad o de desorden dentro de una serie de señales. Como tal, debe entonces ser utilizada como una medida de la complejidad subyacente de cualquier sistema dinámico [22]. El valor clínico del análisis de la complejidad de las variables fisiológicas tiene un gran potencial ya que la presencia de la enfermedad implica siempre una pérdida de complejidad del sistema [4].

La EnAp ha sido utilizada ampliamente en estudios dinámicos de la frecuencia cardiaca. Su aplicación ha aportado conocimiento valioso a la detección de ciertas patologías como en la muerte súbita en lactantes, en los cuales se ha encontrado la frecuencia cardiaca disminuida justo antes de que ocurra ésta, cuando se compararon con lactantes normales [23].

La EnAp puede ser aplicada a series de señales ruidosas y poco extensas siendo de utilidad para medir la variación de un parámetro en donde el muestreo del mismo es difícil, como por ejemplo cuando es no es posible extraer múltiples muestras de sangre o hay relativamente pocos datos sin posibilidad de aumentar su número. Este hecho es

particularmente aparente en la investigación de la variabilidad de los niveles plasmáticos de ciertas hormonas [24]. La EnAp también ha sido aplicada con éxito para investigar la variabilidad de parámetros neurológicos, respiratorios y más recientemente, en el estudio de la temperatura corporal en diferentes circunstancias [25, 26, 27].

1.4. Sistema Inmune como sistema biológico Complejo.

Una de las mayores contribuciones del pensamiento sistémico en la biología es la concepción del cuerpo humano como un sistema complejo (figura 9), en el cual por medio de la evolución integra adaptaciones complejas; que puede ser explicada por reglas simples de cambio en el tiempo. Una de estas adaptaciones complejas es el sistema inmune. Este sistema es una red de moléculas, células y tejidos que interactúan entre sí para mantener la integridad genética y fisiológica de los individuos [28].

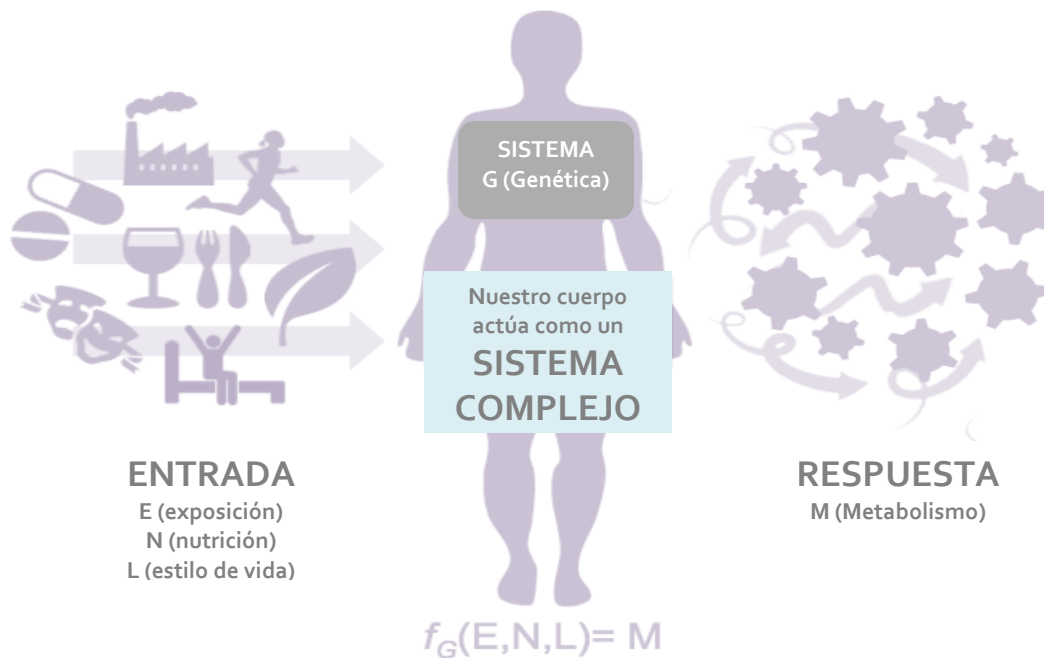


Figura 9. El cuerpo humano es un sistema biológico complejo, el cual no solo es el genoma que tenemos; sino que también es influenciado por los alimentos que comemos, todo lo que hacemos y a los que nos exponemos a lo largo de nuestra vida. Esta heterogeneidad en las características de cada persona es lo que hace que todos tengamos una distinta respuesta a tratamientos.

Por más de 500 millones de años de evolución, los distintos grupos animales han generado diversas estrategias de reconocimiento, neutralización y eliminación de patógenos potenciales, así como también de mecanismos de reparación y homeostasis de tejidos y órganos. Algunas de estas estrategias han permaneciendo conservadas en la mayoría de grupos animales. Otras estrategias son innovaciones propias de ciertos linajes animales cuya fijación ha respondido a las condiciones ambientales propias [28].

El sistema inmune adaptativo o linfocitario específicamente en los humanos es un ejemplo de estas innovaciones y se caracteriza por la presencia de células especializadas (linfocitos) que expresan receptores con una variabilidad casi ilimitada para reconocer un amplio universo antigénico en constante cambio. Estos receptores (inmunoglobulinas y receptores de células T) aparecieron súbitamente en el ancestro de los vertebrados mandibulados como consecuencia de una transferencia horizontal de genes bacterianos que codifican para una enzima con capacidad de cortar y pegar fragmentos de DNA. La evolución del sistema inmune involucra la integración de nuevos módulos sobre una red preexistente de módulos que interactúan entre sí a varios niveles jerárquicos [28].

El sistema inmune puede considerarse como un sistema autónomo y distribuido que carece de un mando central, debido a que las interacciones locales entre células circulantes y residentes en distintos tejidos resultan en la emergencia de propiedades sistémicas que mantienen la integridad de los tejidos contra amenazas internas o externas. El sistema inmune humano está compuesto de aproximadamente un trillón de células, docenas de tipos celulares y cientos de señales de químicas. El sistema inmunológico juega una variedad de papeles homeostáticos, tales como ayudar a dirigir la cicatrización de heridas, pero su trabajo principal es el control de los innumerables patógenos que recorren el cuerpo. Los billones de células del sistema inmune no tiene un punto de control general; las señales del cerebro modulan la acción del sistema inmunitario hasta cierto punto, pero no controlan su funcionamiento detallado [29].

Uno de los papeles más importantes que desempeña el sistema inmune es el de saber qué es lo que está pasando en el cuerpo, vigilando y detectando las partículas o moléculas que no son propias del organismo, al mismo tiempo en distintos lugares; por lo que el sistema se organiza de tal forma para asignar los recursos disponibles para satisfacer adecuadamente un abanico cambiante de desafíos. La regeneración del sistema inmune es una parte esencial para el buen funcionamiento de un sistema, así como los flujos de información que debe de existir entre las partes que conforman al sistema y los cambios en la asignación de recursos para lidiar mejor con las circunstancias cambiantes [28].

El sistema inmunológico humano controla acciones por medio de decenas o centenares de moléculas de tipo regulatorio. Todavía no se han identificado todas las moléculas que

son importantes en la respuesta inmune, pero ellas forman parte de varios receptores de superficie celular y de la familia de las moléculas solubles como las interleucinas que pueden transmitir las señales entre las células [29].

1.5. Regulación de sistema inmune sistémico.

La respuesta inmunitaria, al igual que todos los sistemas biológicos, está sujeta a diversos mecanismos de control que sirven para mantener al sistema inmunitario en un estado de reposo cuando la respuesta a un determinado antígeno ha dejado de ser necesaria. Las respuestas inmunitarias eficaces son el resultado final de una serie de interacciones entre el antígeno y una red de células inmunológicamente competentes. La naturaleza de la respuesta, tanto cuantitativa como cualitativamente, está determinada por muchos factores, entre ellos la forma y vía de administración del antígeno, la carga genética del individuo y cualquier antecedente de exposición previa a ese antígeno ó a otro que presente una reacción inmunológica cruzada con él, o incluso la presencia de anticuerpos frente al antígeno [29].

Regulación por Linfocitos.

Las células T ejercen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune. Las células T cooperadoras (Th), a través de su interacción con las células presentadoras del antígeno, portadoras de péptidos antigénicos asociados con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, desempeñan un papel primordial en la respuesta inmunitaria. Estas células reconocen determinados epítomos y, de este modo, seleccionan aquellos que van a actuar como dianas para las funciones efectoras relevantes, seleccionando y activando las células efectoras apropiadas. Las células T pueden ayudar a las células B a elaborar anticuerpos y a modular las acciones de otras células efectoras, entre ellas las células T citotóxicas (Tc), las células Natural Killer (NK), los macrófagos y los granulocitos. Muchos de estos efectos están mediados por citocinas producidas por las células Th como el INF- γ , IL-2, aunque también tienen importancia las citocinas procedentes de otras células especialmente de los macrófagos [28].

Tanto las células T como las B pueden recibir la influencia de las células T. Contribuyendo a regular el tipo de respuesta inmune, a través de las sub-poblaciones Th1 y Th2. Las células vírgenes que no han sido previamente estimuladas, liberan solamente IL-2. La

estimulación de corta duración conduce al desarrollo de células Th0, que pueden liberar una amplia gama de citocinas. Tras la estimulación crónica surgen los tipos celulares especializados Th1 y Th2. Las células Th1 liberan IL-2 e INF- γ , activando a los macrófagos y favoreciendo la expansión clonal de las células T, y la activación de las Tc y NK. Las células Th2 liberan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 tienden a aumentar la producción de eosinófilos y de mastocitos, así como a favorecer la producción de anticuerpos, incluida la Inmunoglobulina tipo E. Estas células responden bien a los antígenos presentados por las células B. Una vez establecidos estos patrones de respuesta, cada uno de ellos es capaz de suprimir el otro, ya que el IFN- γ procedente de las células Th1 inhibe la proliferación de las células Th2, mientras que la IL-10 reduce la secreción de citocinas (figura 10) [29].

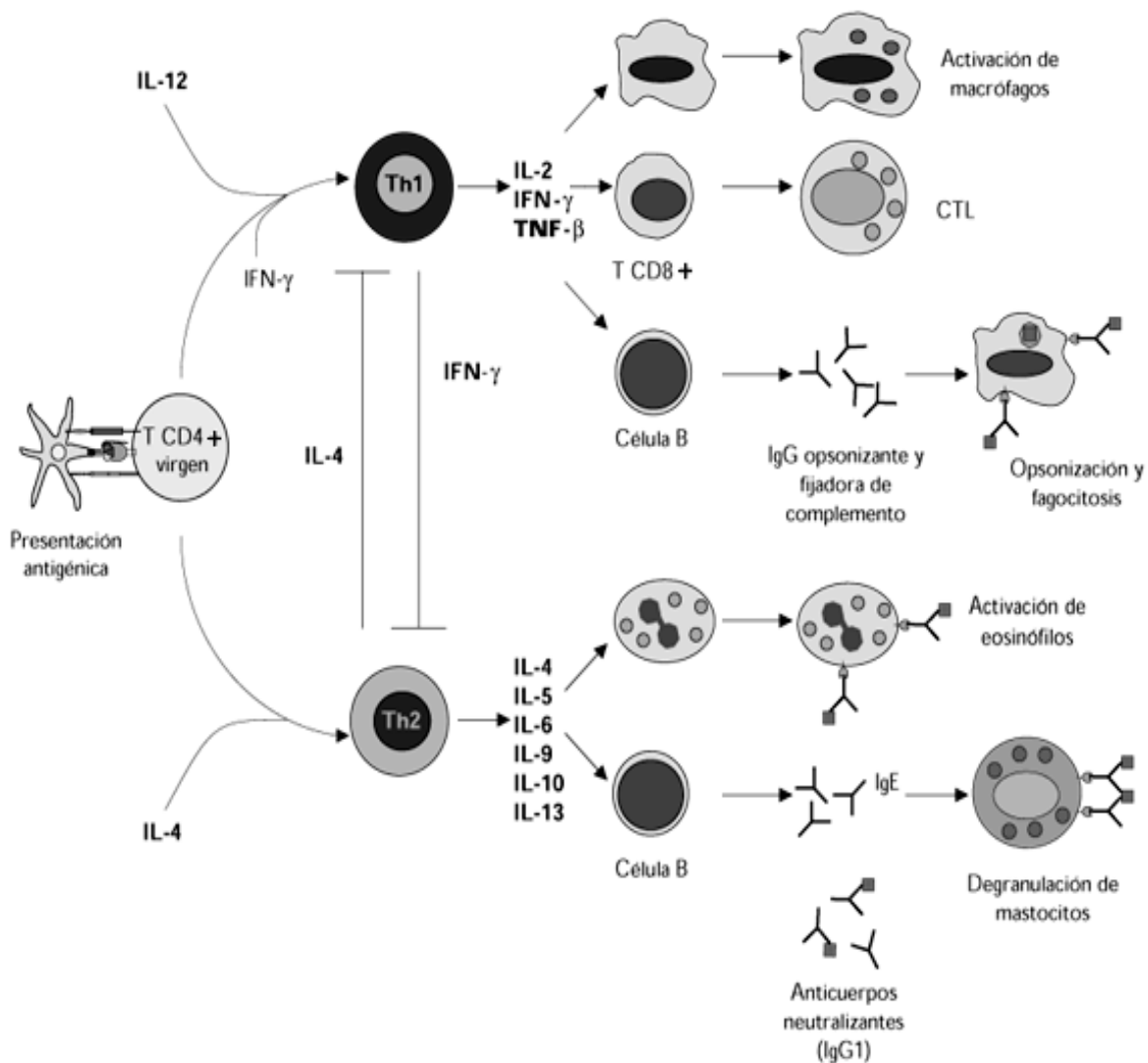


Figura 10. Funciones efectoras de las subpoblaciones Th1 y Th2. Modificado de Abbas y colaboradores, 1996.

Regulación Genética.

Existen muchas formas por las que los genes de cada individuo pueden influir en la respuesta inmune, debido a la capacidad de respuesta inmune dependiente de la genética del individuo. Mediante experimentos de genética molecular se ha determinado la existencia de genes que condicionan o modulan la respuesta inmune [29].

Mecanismos de regulación:

- Influencia del MHC: El polimorfismo de secuencias MHC que cada individuo hereda.
- Genes no ligados al MHC: Controlan la capacidad de respuesta global del organismo a antígenos complejos, como la capacidad del macrófago para procesar Ag o la tasa de proliferación de linfocitos B.

Regulación neuroendocrina.

El sistema inmune al desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, se considera además de un sistema complejo, un sistema regulador como lo son el sistema nervioso y el endocrino. El sistema inmune no trabaja de forma aislada, de hecho está conectado con los otros sistemas reguladores del organismo [30].

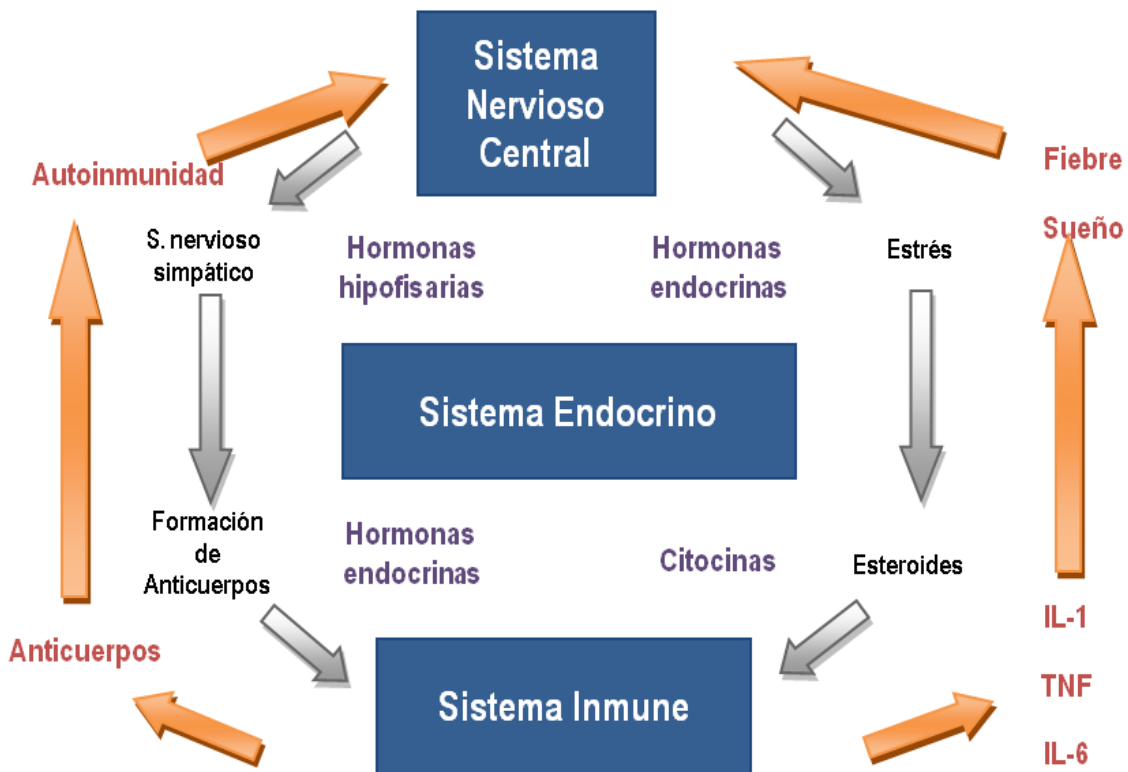


Figura 11. Red de comunicación tri-direccional entre el sistema inmune, el sistema nervioso y el sistema endocrino.

Actualmente existen evidencias que sugieren la existencia de una compleja red de comunicación tri-direccional entre el sistema inmune, el sistema nervioso y el sistema endocrino (Figura 11). El estrés o una infección (inflamación) pueden activar y modificar el equilibrio de las citocinas pro-inflamatorias, y activar tanto al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) como al sistema simpático-adrenal, produciendo la liberación de hormonas, glucocorticoides, y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que inducen cambios cualitativos y cuantitativos en el sistema inmunitario [30].

Se sabe desde hace tiempo que las situaciones de estrés pueden conducir a una supresión de las funciones inmunitarias, como la respuesta de los linfocitos a los mitógenos, o la capacidad de recuperación frente a la infección. Sin embargo, es mucho más difícil hallar relaciones directas a nivel celular o molecular que expliquen estas observaciones [30].

1.6. La complejidad del sistema inmune.

Los mecanismos inmunes mantienen la integridad fisiológica y genética del organismo, mediante los mecanismos de reconocimiento y respuesta inmune que no se restringen a la detección y eliminación de microorganismos potencialmente patógenos. El sistema inmune es un sistema homeostático que mantiene la integridad de los tejidos a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo. El sistema inmune participa activamente en el adecuado ensamblaje de tejidos y órganos durante la ontogenia, así como también el mantenimiento de su integridad en etapas adultas mediante la detección y eliminación de células senescentes o defectuosas. Así mismo, el sistema inmune mantiene la integridad genética de organismos coloniales, evitando la fusión de individuos no relacionados genéticamente [28].

El sistema inmune tiene la arquitectura de una red compleja: el comportamiento de la mayoría de sistemas complejos emerge de la interacción entre sus componentes. Estas redes de interacción describen varios sistemas biológicos, como por ejemplo las vías metabólicas, la regulación de la expresión génica y las interacciones proteína-proteína, que se caracterizan por tener una topología libre de escala. Estas topologías siguen una ley de potencias, en donde la gran mayoría de los nodos tienen muy pocos vínculos, mientras que unos pocos nodos están altamente conectados. En el sistema inmune existen muchas de estas redes de interacción entre células, entre receptores y sus ligandos, entre citocinas, entre anticuerpos, etc. [28].

Las redes inmunes son modulares y jerárquicas: ciertamente, uno de los principios arquitectónicos de los organismos vivos es la modularidad. Los módulos son conjuntos de elementos altamente integrados y cuasi independientes de otros módulos. La arquitectura modular de los organismos vivos les confiere una mayor robustez ante perturbaciones y les permite una mayor plasticidad evolutiva, pues los módulos pueden actuar como unidades de selección natural, proveyendo que estos cumplan la máxima darwiniana de descendencia con modificación. Los módulos pueden originarse de otros módulos preexistentes mediante adquisición de nuevas funciones. Por lo que el sistema inmune, así como los organismos mismos, tiene una arquitectura modular. Pero estos módulos se pueden organizar para formar una red jerárquica [28].

1.7. El cáncer como un sistema biológico complejo.

El cáncer es una entidad "parasitaria", de crecimiento no controlado, resultante de alteraciones génicas. Hoy se acepta que no importa cuál sea el agente inductor, el cáncer en última instancia es el resultado de cambios en los ácidos nucleicos cromosómicos de la célula afectada, cambios que dan lugar a la organización y crecimiento autónomo de un nuevo sistema biológico en el organismo del huésped. La investigación y el manejo del cáncer han sido tradicionalmente enfocados desde la óptica de las ciencias naturales, puesto que los problemas del cáncer tienen que ver con diferenciación celular y con regulación del crecimiento, a la luz de la genética [31].

Pero el cáncer es más allá de una ciencia natural, es parte de la *teoría de caos* y de la *ciencia de la complejidad*, es un fenómeno aleatorio en un *organismo complejo adaptativo de no-equilibrio*. Por lo que el cáncer de por sí es una *estructura disipativa*, muy alejada del equilibrio, un nuevo estado de la materia que depende de flujos continuos de energía y recursos provenientes del huésped, o sea del organismo humano sobre el cual se conformó, pero que exhibe una tendencia hacia el crecimiento continuo e ilimitado. Una manera de controlarlo sería induciendo su equilibrio químico y biológico, o sea deteniendo sus procesos de auto organización y perpetuación. La célula cancerosa no obedece a los impulsos regulatorios del organismo. Cualquier cambio, en cualquier lugar, puede influir en forma devastadora sobre la totalidad del sistema, que es el organismo sobre el cual se desarrolla la neoplasia [32].

Los efectos carcinogénicos son irreversibles: las células no pueden recuperarse de la acción de un agente carcinogénico químico. La carcinogénesis es un proceso acelerado, en el cual las dosis del agente cancerígeno se acumulan en forma amplificada (Figura 12). Su comportamiento, como entidad definida, es caótico e impredecible por los métodos de análisis convencionales, y sólo puede ser expresado en términos no de certidumbres sino de probabilidades. Por lo que el cáncer establece un nuevo patrón de dispersión gracias a su estado muy alejado del equilibrio y al continuo crecimiento del tejido cancerígeno mediante la organización dependiente del flujo de energía y recursos provenientes del huésped, el cual es un sistema adaptativo. Cuando la capacidad de adaptación del huésped es sobrepasada por el neoplasma, éste adquiere la categoría metabólica y estructural de "organismo primario" y el huésped va a la muerte [33].

De forma normal y bajo la perspectiva de la dinámica de los organismos complejos adaptativos (seres humanos) con el paso del tiempo, el organismo humano va inexorablemente hacia el deterioro y la muerte debido a la entropía creciente. Por el contrario, el cáncer aparece como un sistema de organización y crecimiento "desbocado", ilimitado y, por consiguiente, es un sistema autónomo de entropía decreciente. La combinación del organismo huésped y su tumor es de naturaleza opuesta e implica un manejo diferente: disminuir la entropía en el paciente y aumentarla en el tumor [34].

Teóricamente, el crecimiento del cáncer y su impacto sobre el huésped pueden ser controlados a la luz de las teorías de caos, complejidad, organismos adaptativos y estructuras disipativas interrumpiendo la formación del nuevo orden estructural y funcional o controlando sus procesos metabólicos para llevarlos al equilibrio, o sea a la suspensión, o bien estimulando la adaptación del huésped a la estructura parasitaria de cuya propia materia se originó (31).

Síndrome disfuncional multisistémico.

Los seres humanos, al igual que otras formas de vida, pueden ser vistos como sistemas termodinámicamente abiertos que consumen continuamente energía para mantener la estabilidad en el medio interno. El cuerpo humano no solo debe de mantener la estabilidad de las células individuales, sino también de todo el organismo en su conjunto. Con este fin, una gran cantidad de sistemas fisiológicos evolucionaron para realizar distintas tareas y son denominados como sistemas. Estos sistemas respiratorio, circulatorio, digestivo, neurológico, etc. Comparten distintas características como [35]:

- Los sistemas fisiológicos están distribuidos espacialmente (tienen una dirección).
- Los sistemas fisiológicos tienen un espacio y están estructurados de manera jerárquica (existe una arquitectura que facilita la función anidada: micro-vellosidad a vellosidades y mucosa intestinal; alveolo a la unidad alveolar para segmentos bronquiales; capilar para arteriola y a la arteria).
- Los sistemas fisiológicos están funcionalmente integrados (La ingestión y la entrega de exceso de líquido en la circulación es seguida rápidamente por la producción aumentada de orina).
- Los sistemas fisiológicos tienen ritmos característicamente variables que pierden su variabilidad en el envejecimiento y la enfermedad [36].

Las tres primeras características de los sistemas fisiológicos tienen consecuencias médicas. Tanto el envejecimiento y la enfermedad pueden comprometer uno o más sistemas fisiológicos.

El síndrome de disfunción orgánica múltiple generalizada, progresiva y desproporcionada (MODS) es el cúmulo de fallas en los sistemas. Al igual que un automóvil viejo con cojinetes gastados, mangueras rotas, y las válvulas del motor con fugas; todos los seres humanos a lo largo de la vida van sumando fallas a sus sistemas que van deteriorando a el conjunto de sistemas y terminan por adquirir una enfermedad severa (cáncer) de la que no pueden responder con éxito, por lo que las personas mueren debido a múltiples órganos que no cumplen su función apropiada [37,38].

A pesar de una intervención oportuna y apropiada en una falla de los sistemas, la mortalidad es proporcional al número y la profundidad de la disfunción del sistema [39]. Desafortunadamente, el MODS sigue siendo la principal causa de muerte en la mayoría de las unidades de cuidados intensivos.

1.8. Arquitectura de redes biológicas.

Un objetivo ambicioso de la investigación biológica contemporánea es la dilucidación de las estructuras y funciones de las redes que constituyen las células y los organismos. En los sistemas biológicos, las redes aparecen en muchos disfraces diferentes, que van desde las interacciones de proteínas hasta las redes metabólicas. La aparición de estas redes es impulsada por los procesos de auto-organización que se rigen por leyes simples pero genéricas. Durante el estudio de los sistemas complejos y entendiendo las relaciones de diferentes unidades que interactúan, se ha hecho evidente que la topología de las diferentes redes comparten un origen biológico con las mismas características pero a distintas escalas [40].

La comprensión de sistemas complejos a menudo requiere un enfoque de abajo hacia arriba, rompiendo el sistema en componentes pequeños y elementales y definiendo las interacciones entre estos componentes. Pero en muchos casos, los componentes de estas interacciones se caracterizan mejor como redes. Por ejemplo, la sociedad es una red de personas conectadas por varios enlaces, incluyendo amistades, colaboraciones de trabajo, o coautorías científicas [40].

En los sistemas biológicos existen muchas redes que van desde la alimentación por medio de redes bioquímicas en la biología molecular. En particular, la amplia gama de interacciones entre los genes, las proteínas y metabolitos que en una célula están representados por diferentes redes complejas.

Durante la última década, la genómica ha producido una increíble cantidad de los datos de interacción molecular, lo que contribuye a los mapas específicos de las redes celulares. De hecho, extensos mapas de las interacciones de proteína-proteína se han generado en una variedad de organismos, incluyendo virus [41], procariontes, como *H. pylori* [42], y eucariontes, como *S. cerevisiae* [43] y *C. elegans* [44]. Más allá del enfoque actual sobre el descubrimiento de la estructura de los genomas, proteomas y las interacciones de diversos organismos, algunos de los más amplios conjuntos de datos son los mapas metabólicos [45], que cataliza un número creciente de estudios, centrado en la arquitectura de la metabolismo [46].

Las redes nos ofrecen una nueva manera de clasificar los sistemas bajo un marco único. En este enfoque se han descubierto similitudes inesperadas entre la organización de diversos sistemas complejos, lo que indica que las redes se rigen por los principios y mecanismos de organización genéricos. La comprensión de las fuerzas motrices en el que invierten diferentes redes con características topológicas similares permite a la biología de sistemas combinar los numerosos detalles acerca de las interacciones moleculares en un marco único, ofreciendo los medios para hacer frente a la estructura de la célula como un todo [40].

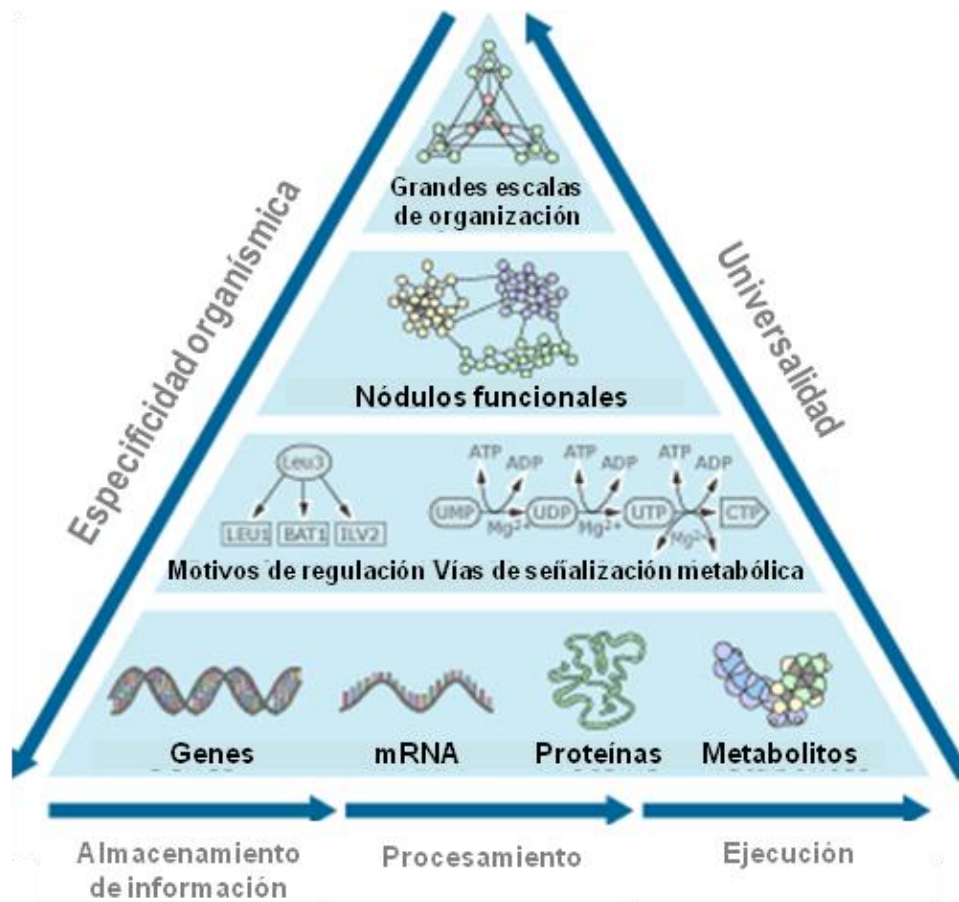


Figura 12. De lo particular a lo universal. El nivel 1 de la pirámide nos muestra una representación esquemática de la organización funcional de la célula: genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. Dentro de la célula la organización se puede obtener considerando las conexiones entre los componentes como relaciones funcionales, como motivos reguladores y vías de señalización metabólicas (nivel 2), que son los bloques de construcción de los módulos operacionales (nivel 3), los cuales se van anidando y generando una arquitectura heterárquica libre de escalas (nivel 4). Los componentes individuales son únicos y las propiedades topológicas de las redes biológicas, comparten similitudes. Lo que sugiere que el universo está organizado por principios que aplican a todos los tipos de redes complejas.

Es ampliamente aceptado que las diferentes funciones celulares (almacenamiento de información, procesamiento y ejecución) se llevan a cabo por el genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. Aunque la distinción funcional entre estos niveles de organización no siempre es clara. Una manera de visualizar las complejas relaciones entre estos, es organizarlos en una pirámide de complejidad sencilla [47] en el que varios componentes, genes, ARN, proteínas y metabolitos se organizan en patrones jerárquicamente recurrentes, tales como las rutas metabólicas y motivos de regulación genética. A su vez, los motivos y las vías se integran a la perfección para formar módulos funcionales que son responsables de las funciones celulares distintas [48]. Estos módulos se encajan de forma jerárquica y definen la organización a gran escala de la célula (Figura 12) [40].

La aparición de modos jerárquicamente organizados en redes biológicas apoya la hipótesis de que la evolución actúa en muchos niveles. La acumulación de cambios locales, que afectan a los pequeños módulos altamente integrados, poco a poco van generando impactos de los módulos más grandes. Por lo tanto, la evolución podría actuar copiando y reutilizando los módulos existentes para aumentar aún más la complejidad del organismo. Lo que explicaría la explosión de complejidad en el desarrollo de la unicelularidad hacia los multicelulares por medio del engrosamiento de redes [40].

Nuestro conocimiento actual sobre la arquitectura de las redes biológicas hace hincapié en dos aspectos principales:

- Las funciones celulares discretas están mediadas con la ayuda de distintos módulos.
- La integridad de la red está asegurada por un conjunto de nodos altamente conectados, por lo que las redes robustas le pueden hacer frente a fallos aleatorios, pero son extremadamente vulnerable a los ataques dirigidos.

Estas características explican la observación de que muchas mutaciones tienen poco o ningún efecto fenotípico, debido a que la presencia de genes que fracasan su función puede ser sustituida por otros componentes de la red [49].

La presencia de genes que integran múltiples señales, pueden desencadenar cambios generalizados cuando estos fracasan. Demuestra el papel crucial de los genes altamente

conectadas. Por ejemplo, el tumor supresor de gen p53 ha sido identificado como un nodo altamente conectado y por lo tanto fundamental. Una vez que ha mutado, pone en peligro gravemente la estabilidad del genoma y la integración de las señales relacionadas con el control del ciclo celular y la apoptosis [50]. Haciendo hincapié en su papel crucial, las proteínas p53 disfuncionales están involucradas en más de la mitad de todos los fenotipos de cáncer humano.

Desde un punto de vista biomédico, las proteínas en general están altamente conectadas con el fin de mantener la integridad de los módulos que pueden ser percibidos como factores de la enfermedad y estos mismos nodos son blancos potenciales para los medicamentos. Con la creciente capacidad de identificar y recopilar las interacciones proteína-proteína, la determinación de módulos y proteínas altamente conectadas se convertirá en un problema importante, para la identificación rápida y eficaz de los posibles blancos farmacológicos [40].

El progreso reciente en las redes biológicas ha descubierto sucesivamente el esqueleto y la organización de redes, ofreciendo puntos de vista importantes sobre el montaje y la funcionalidad de los componentes y subredes. En el futuro tendremos que ir varios pasos más allá, abordando los aspectos dinámicos de las diferentes redes celulares [40].

Redes de interacción de proteínas.

Las interacciones de proteínas ofrecen una nueva forma de estudiar las redes celulares, teniendo en cuenta las proteínas como nodos y las interacciones físicas como enlaces. Aunque los datos de interacción de proteínas se obtienen de diferentes fuentes y se recuperan por diferentes métodos, la aparición de la propiedad libre de escala parece ser una característica robusta. Como se mencionó anteriormente, las redes libres de escala son vulnerables a los ataques dirigidos en sus nodos altamente conectados. Por lo tanto, se espera que las mutaciones de proteínas altamente conservadas sean letales para la célula. Esta predicción es apoyada por mediciones explícitas [51]. La figura 5 representa la red de interacción de proteínas de levadura, que ilustra la característica básica que los centros mantienen muchos nodos escasamente conectados entre sí.

Citocinas.

Las citocinas son un grupo heterogéneo de pequeños polipéptidos o glicoproteínas solubles, que ejercen efectos pleiotrópicos y redundantes que promueven el crecimiento, la diferenciación y la activación de células normales [52]. Las citocinas pueden tener ya sea la actividad pro o anti inflamatoria, dependiendo del microambiente. Las células inmunes son la principal fuente de citocinas, pero muchas células humanas son capaces de producirlas [52, 53] (Tabla 1) y son producidas como un medio de comunicación entre células y tejidos.

Tabla 1. Citocinas, inmunidad e inflamación.

Actividad	Citocinas y receptores
Inmunidad mediada por células (Pro-Inflamatorias)	IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ
Inmunidad humoral (Pro-Inflamatorias)	IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-25, TGF- β
Inmunidad Alérgica (Pro-Inflamatorias)	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IFN- γ , GM-CSF, SCF
Anti-Inflamatorias)	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, TGF- β , IL-1RA, señalizado por IL-1RII

Las citocinas y el desarrollo del cáncer.

Los estudios clínicos y epidemiológicos han sugerido una fuerte asociación entre la inflamación local crónica y algunos tipos de cáncer [54]. Prehn reportó por primera vez en 1972 que las células inmunes promueven el crecimiento del tumor en un modelo animal [55], y ahora se establece que el estroma tumoral incluye células inflamatorias, como los macrófagos M2, células dendríticas y linfocitos T reguladoras [56], que promueven el desarrollo y la progresión de cáncer [56, 57 y 58] (figura 13). El microambiente del tumor es rico en citocinas y otros mediadores inflamatorios que influyen en la inmunosupresión, el crecimiento de las células cancerosas, la remodelación de tejidos y angiogénesis [59, 60, 61].

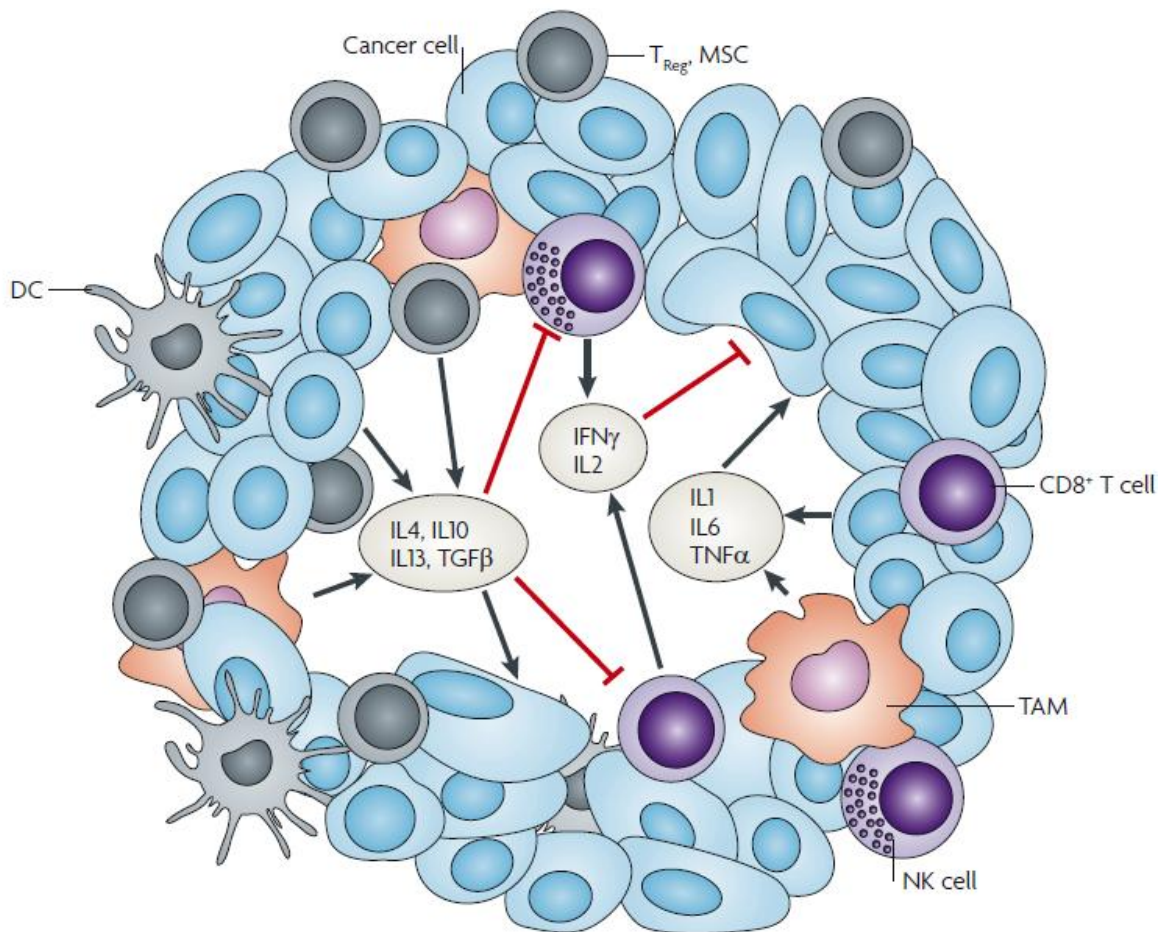


Figura 13. Papel que desempeñan la mayor parte de las citocinas en el microambiente tumoral. El cáncer coexiste con células del sistema inmune como: Macrófagos asociados a tumores (TAM), células T- regulatorias (Treg), células dendríticas (DCs) y células mieloides supresoras (MSCs). Los TAM y Treg son los mayores precursores de citocinas anti-inflamatorias, así como las células T cooperadoras 2 (Th2) producen: IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β , la cual suprime la inmunidad anti-cancerígena. Mediado por las células asesinas naturales (NK), los linfocitos T CD8+ y las citocinas pro-inflamatorias como: IL-2, IFN- γ . En un ambiente de inmunosupresión se producen varias citocinas generadas por las células de la inmunidad innata y las células que conforman al cáncer, las cuales promueven directamente el crecimiento tumoral.

Cuando se presenta una enfermedad como el cáncer, es el reflejo del continuo disturbio en los sistema que alteran la función de la redes, evitando que estas realicen su función correctamente. Generando y exacerbando reacciones que benefician al crecimiento tumoral, como lo es una respuesta inflamatoria. Un ejemplo de esto es que la citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β no parecen realizar su función normal, que es inhibir la respuesta inmune mediada por células contra las células del cáncer [62]. Por otra parte, la

función de las células T circulantes a menudo se ve afectada en cáncer [63]. Los datos clínicos muestran una disminución en la proporción de las células Th1 circulantes a células Th2 y sus citocinas asociadas en diferentes tipos de cáncer y en condiciones inflamatorias crónicas que están asociados con un mayor riesgo de cáncer [64].

Se han realizado pocos estudios sobre los niveles circulantes de citocinas en las personas con cáncer y en los sobrevivientes de cáncer. Datos preliminares de otros estudios indican que los niveles circulantes de varias citocinas pro y anti inflamatorias y angiogénicas son sustancialmente más altos en personas con cáncer que en los controles sanos.

Papel de las citocinas en las respuestas inflamatorias e inmunes.

La inmunidad innata es de corta duración y es la primera línea no específica, de la defensa del huésped que depende de las células de tipo mielóide (por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y mastocitos) y linfóide (por ejemplo, células NK) [65]. Varias células inmunes innatas y otras expresan receptores de la línea germinal, incluyendo los receptores de tipo Toll (TLRs); estos receptores reconocen una variedad de antígenos microbianos exógenos y endógenos, que incluyen ácidos nucleicos y proteínas de choque térmico. Cuando se activan, los TLR conducen a la activación del factor nuclear kappa B y la producción de citocinas, que regula la naturaleza y magnitud de las respuestas inflamatorias adaptativas [66-68].

Las células cancerosas pueden adquirir propiedades características de las células de la inmunidad innata, que no sólo producen citocinas, sino también pueden expresar TLR funcionales [69-71]. Durante una respuesta inmune innata los macrófagos se activan y forman un continuo entre macrófagos tipo 1 y 2, que producen diferentes citocinas y receptores de citocinas. Macrófagos tipo 1 estimulan respuestas mediadas por células a través de la producción de citocinas pro - inflamatorias como IL-1 , IL-6 , IL-12 , IL-23 y TNF, mientras que los macrófagos tipo 2 estimulan la respuesta humoral, la remodelación tisular y la angiogénesis a través de la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y TGF- β [72]. Los macrófagos tipo 2 se encuentran comúnmente entre las células huésped que se infiltran en la mayoría de los tumores [56].

Las células del sistema inmune adaptativo son activadas más tarde e inducen una respuesta inmune de larga duración y específica mediada por células T CD4+ cooperadoras, células T CD8+ citotóxicas y células B [73]. Redes complicadas de citocinas producidas después de la activación de la respuesta innata del sistema inmune promueven la diferenciación de las células CD4 + Th0 en subtipos de células: Th1, Th2, Th17 [85] (Figura 14). Las funciones de las células Th1 y Th2 se refieren a las citocinas distintivas que producen: en general las citocinas Th1 apoyan las respuestas inmunes mediadas por células, incluyendo la inmunidad citotóxica contra las células cancerosas, mientras que las citocinas Th2 apoyan las respuestas: humoral, alérgicas y anti inflamatorias [74, 75, 76] (Tabla 1). Las citocinas características del perfil Th1 (IFN- γ) y citocinas Th2 (IL-4 y IL-10) inhiben la diferenciación y la función del fenotipo recíproco. Células Th17 son responsables de la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes [77], pero su papel en el cáncer es incierto [78].

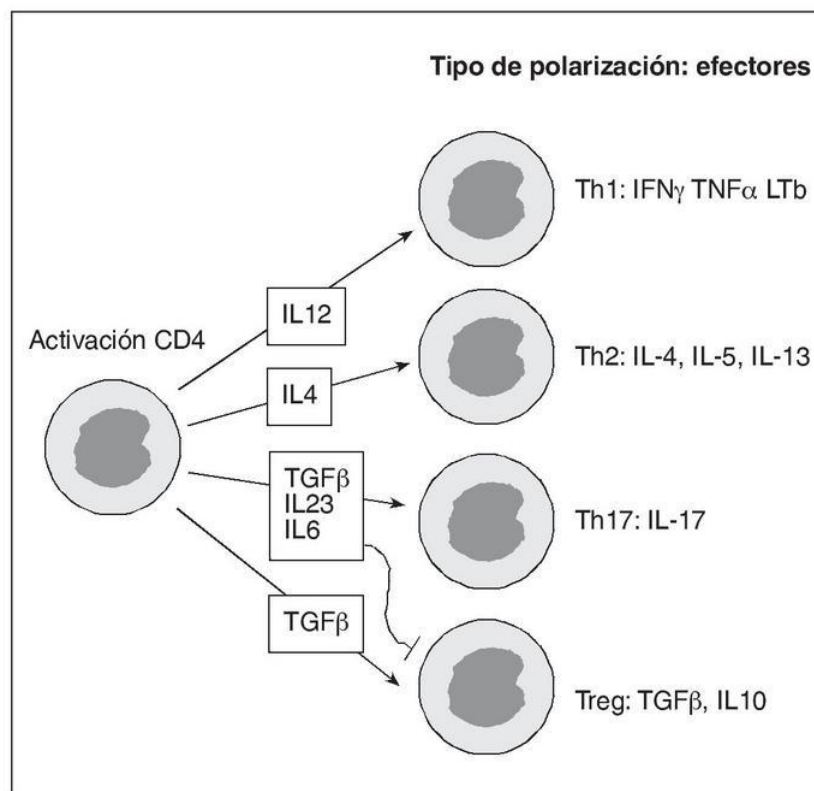


Figura 14. Prehn fue el primero en reportar en 1972 que las células inmunes promueven el crecimiento del tumor en un modelo animal, y ahora se ha establecido que el estroma tumoral incluye células inflamatorias, tales como los macrófagos M2, células dendríticas y linfocitos T-reguladores, que promueven el desarrollo y progresión del cáncer. En condiciones normales, una respuesta inflamatoria está regulada por mecanismos activos. Citocinas anti-inflamatorias, tales como la interleucina 10 y TGF- β , son importantes en este proceso, como son receptores solubles que neutralizan la actividad de citocinas, tales como el receptor de tipo II de IL1 (IL1R2), y antagonistas de los receptores de citocinas, tales como IL1RA.

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer se presenta con una enorme variabilidad en los patrones de severidad, estabilidad y duración en los ritmos fisiológicos que están asociados a la enfermedad y pueden estar involucrados en su patogénesis. Por lo que, el reconocimiento de la extraordinaria complejidad del proceso neoplásico y de los constantes fracasos en el tratamiento de la enfermedad ponen de manifiesto la necesidad por incursionar en nuevas investigaciones que aporten elementos para la comprensión del proceso tumoral como una alteración funcional sistémica del organismo y comprender los niveles de complejidad, versatilidad y robustez del cáncer como un sistema biológico complejo. Con el fin de poder entender el verdadero origen de casi todas las relaciones de redes de genes y proteínas involucradas en el proceso neoplásico.

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial en la actualidad. En general, las tasas de mortalidad debidas a esta enfermedad tienden a aumentar dado que representa a uno de los tipos de cáncer más invasivo y letal. En México el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes entre hombres y mujeres. La tendencia indica que en los próximos años la incidencia y mortalidad por este tipo de cáncer aumentará en nuestro país.

A pesar de los intensos programas de concientización sobre el consumo del tabaco y de los constantes intentos por detectarlo en fases tempranas, esta enfermedad se diagnostica generalmente en estadios avanzados y con un pronóstico pobre. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) el número de casos también va en aumento, siendo el adenocarcinoma el subtipo histopatológico más frecuente.

Se ha demostrado la presencia, importancia y correlación clínica de diversas citocinas individuales en CP. Sin embargo, no se han desarrollado modelos que permitan generar patrones pronósticos o de supervivencia de utilidad clínica que integren los valores de varias citocinas de manera simultánea.

VII. HIPÓTESIS.

- El análisis por minería de datos de las múltiples citoquinas cuantificadas en plasma de pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados (IIIB y IV) por medio de ensayos multiparametricos, permitirá generar grupos (Clusters) de pacientes de cancer de pulmón de células no pequeñas que se pueden asociar con el pronóstico clínico (sobrevida) de los mismos.

VIII. OBJETIVOS.

Objetivo General

Cuantificar las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF; las citocinas de perfil TH1/Th2/Th17, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17a; anti-angiogénicas IL-27, IL-29; pro-angiogénicas, IL-31 e IL-33 en plasma de sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón correlacionando las características clínico-patológicas con los valores de las citocinas y analizar su posible asociación pronóstica.

Objetivo específicos

- Evaluar la utilidad del panel de citocinas analizado por minería de datos como potencial biomarcador de la enfermedad.
- Proponer un panel para el grupo de citocinas relevante que resulte del análisis por minería de datos de los pacientes estudiados y aplicarlo en un estudio prospectivo y/ longitudinal.

IX. MÉTODOS.

Diseño del estudio.

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo que incluyó a 110 pacientes con cáncer pulmonar de estirpe adenocarcinoma en estadios IIB y IV de la Clínica de Cáncer de Pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas y a 25 sujetos sanos. Se realizó un estudio observacional con muestreo transversal que permitió evaluar si la expresión de un grupo de citocinas, permite estimar su utilidad como un biomarcador pronóstico potencial.

❖ *Pacientes*

Crterios de inclusión

1. Se incluyeron aquellos pacientes que entendieron y firmaron el consentimiento informado.
2. Se incluyeron aquellos pacientes que junto con un cuadro clínico-radiológico compatible con cáncer de pulmón, cumplieron al menos una de las siguientes condiciones y que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.
 - a) Citología positiva para malignidad en esputo, aspirado bronquial, cepillado bronquial, punción aspirativa pulmonar, líquido pleural o punción de otras localizaciones metastásicas.
 - b) Biopsia positiva para malignidad de origen bronquial, transbronquial, pleural, pulmonar percutánea, pulmonar por toracotomía o de localizaciones metastásicas.
3. Edad ≥ 18 años.
4. Estado general con puntuación según ECOG entre 0 y 2 ó con un Karnofski $\geq 60\%$.

Crterios de exclusión

1. Se excluyeron aquellos sujetos con un tipo histológico diferente al adenocarcinoma.
2. Aquellos que hayan recibido tratamiento quirúrgico, radiológico o de quimioterapia previo.
3. Sujetos con inflamaciones agudas.
4. Sujetos con infección por VIH u otras inmunodeficiencias.
5. Sujetos con infecciones no controladas.

Los criterios de exclusión 3, 4 y 5, se han indicado con el fin de evitar posibles interacciones inmunológicas sobre los factores estudiados. La subpoblación de estudio puede estar incrementada en las patologías descritas, lo que interferiría con la descripción de los resultados.

Criterios de eliminación

1. Retiro del consentimiento informado

❖ *Sujetos sanos*

Criterios de inclusión

1. Se incluyeron aquellos sujetos que entendieron y firmaron el consentimiento informado.
2. Se incluyeron los que no reportaron hábito tabáquico al menos en los últimos 10 años.
3. Se incluyeron sujetos sin síntomas de cualquier enfermedad respiratoria en las dos semanas anteriores a la toma de la muestra.

Criterios de exclusión

1. Personas menores de 45 años y mayores de 75.
2. Mujeres embarazadas.
3. Sujetos con algún tratamiento dos semanas previas a la toma de muestra, incluyendo corticosteroides.
4. Aquellos sujetos que tengan antecedentes familiares de cáncer de pulmón.
5. Sujetos con otro diagnóstico oncológico.
6. Sujetos con enfermedades autoinmunes (VIH, artritis, lupus, etc.).
7. Pacientes con enfisema pulmonar.

El criterio de exclusión 1, se han indicado con el fin de evitar posibles interacciones inmunológicas sobre los factores estudiados y tener poblaciones pareadas por edad con los pacientes. Y el criterio 3, 4, 5, 6 y 7 debido que la subpoblación de estudio puede estar incrementada en las patologías descritas o algún tratamiento interfieran con la descripción de los resultados.

Criterios de eliminación

1. Retiro del consentimiento informado.

Consideraciones éticas

Este proyecto así como las cartas de consentimiento informado para sujetos sanos y pacientes han sido sometidos a los Comités de Bioética de las instituciones participantes [INCAN (011/018/ICI) (CV/683)] e INER (B06-12).

Metodología experimental

Se incluyeron 110 pacientes confirmados con histopatología de CPCNP sin tratamiento previo y 25 sujetos sanos. Se realizaron inmunoensayos de cuantificación múltiple de analitos asociados a perlas mediante citometría de flujo (CBA, Cytometric Bead Array, BD Biosciences) y kits de ELISA BioLegend Max.

❖ *Obtención de plasma de muestras de sangre periférica*

Las muestras de sangre venosa periférica se colectaron en tubos estériles de 8 ml recubiertos con EDTA para todos los pacientes y sujetos sanos; dentro de la 1 hora se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min; se tomó la primera fracción que se forma en el gradiente y se dividió en partes (alícuotas) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

❖ *Cuantificación de las citocinas IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12, IL4, IL-17, IFN-g por ensayo de cuantificación de analitos solubles (CBA)*

La capacidad para cuantificar mediadores solubles involucrados en la regulación de los procesos inmunológicos ha constituido un foco de atención importante para los investigadores biomédicos por más tres décadas. Los esfuerzos han sido dirigidos a la medición de analitos múltiples, como citocinas y sus receptores, quimiocinas o factores de crecimiento involucrados en procesos de regulación celular *in vivo* e *in vitro*.

La importancia de realizar dichas mediciones radica en el hecho de que estas moléculas constituyen la base de sofisticadas redes de comunicación celular tanto de procesos inmunes en estado de salud como de enfermedad.

Como es bien conocido por todos, los inmunoensayos como los son las ELISAs por sus siglas en inglés (Enzyme-linked immunosorbent assay) permiten cuantificar de manera

específica y precisa moléculas como citocinas u otras proteínas de manera individual. Esta característica hace de estos ensayos una técnica costosa y que requiere de una inversión de tiempo considerable cuando lo que se pretende es la cuantificación simultánea de diversos mediadores involucrados en un proceso determinado.

Ante la necesidad del desarrollo de métodos de detección múltiple de proteínas, diversas compañías, han desarrollado un método de detección de analitos múltiples basados en perlas, incorporando plataformas de análisis de datos que permiten obtener una gran cantidad de información cuantificable en tiempos cortos y sobre todo que han permitido la cuantificación simultánea en volúmenes de muestra muy pequeños utilizando la citometría de flujo. Esto ha permitido optimizar las muestras biológicas que se obtienen, así como el tiempo y el costo que se invierte en la realización de estos ensayos.

Los ensayos (CBA); están basados en la utilización de perlas sintéticas y el uso de la citometría de flujo como herramienta para la detección de citocinas, tanto en humanos y ratones a partir de sobrenadantes de células, muestras de suero o plasma. Dichas perlas tienen un diámetro aproximado de 4-7.5µm, presenta grupos carboxilos en la superficie, lo que proporciona una gran capacidad de unión al anticuerpo del cual se encuentra recubierta, y una gran área de contacto comparada con una placa convencional de ELISA.

Cada conjunto específico de perlas están marcadas internamente con diferentes concentraciones de una sonda que emite una señal fluorescente que es posible medir en un canal de fluorescencia específico y discreta que puede ser resuelto por el FL-3 de canal de un citómetro de flujo.

El proceso en general consiste en la incubación de las perlas de captura, con la muestra de interés, se lavan, y después se incuban con un segundo anticuerpo de detección conjugado con PE. De esta manera, una perla que es positiva para una citocina emite fluorescencia tanto para el canal PE y FL-3, mientras que las perlas que no se le acoplaron las citocinas solo emite fluorescencia para el canal FL-3.

La ventaja de esta técnica es que nos permite cuantificar múltiples proteínas simultáneamente. El sistema utiliza una amplia y dinámica gama de detectores de fluorescencia ofrecida para citometría de flujo combinado con perlas revestidas de

anticuerpo para la captura eficiente de analitos de interés. Cada perla cuenta con una matriz la cual tiene una intensidad de fluorescencia única, de tal manera que las perlas se pueden mezclar y ejecutar de forma simultánea en un único tubo. Este método reduce significativamente los requisitos de la muestra y el tiempo de los resultados en comparación con técnicas tradicionales. Además de que el ensayo permite incorporar estándares con concentraciones conocidas de cada proteína que se cuantifica, y el programa de análisis interpola los valores obtenidos de las muestras en las curvas estándar, cuantificando de manera simultánea las proteínas presentes en las muestras.

La cuantificación de las concentraciones de las citocinas proinflamatorias (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF y IL-12) y citocinas de perfil Th1, Th2, Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, INF- γ) se realizarán por este método utilizando los kits (CBA BD Human Inflammatory Cytokine Kit y CBA Human Th1, Th2, Th17 Cytokine Kit) en plasma de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos.

❖ *Cuantificación de IL-27, IL-29, IL-31 e IL-33 por ELISA*

Para la cuantificación de estas citocinas se utilizarán kits comerciales de ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BioLegend Max)

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Diseño estadístico del estudio

❖ *Tamaño de muestra del estudio*

Se incluyeron a 110 pacientes con cáncer pulmonar en estadios IIB y IV de la Clínica de Cáncer de Pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Debido a que no existen reportes de la expresión simultánea de las citocinas propuestas en el panel a evaluar y en base a estudios similares en otros tipos de cáncer donde el tamaño de muestra oscila entre los 50 y 150 pacientes y que arrojan diferencias significativas, estimamos que el análisis de 110 pacientes nos permitirá evaluar las diferencias en la expresión de las distintas citocinas.

❖ *Análisis por minería de datos*

Se aplicaron técnicas de clusterización para dividir a los pacientes en grupos naturales de acuerdo a los valores de 14 citocinas. Los grupos formados son exclusivos, esto es, cada paciente pertenece a un grupo, o bien, pueden ser probabilísticos, es decir, un paciente pertenece a un grupo con una cierta probabilidad. Se utilizaron algoritmos diferentes: k-means, para el primer caso, y EM, para el segundo.

En el algoritmo k-means, el parámetro k corresponde al número de clúster a formar. Se elige aleatoriamente a un paciente, y el conjunto de sus valores de citocinas son considerados como el centro inicial del primer clúster. Lo mismo ocurre para el resto de los clusters. Después, se calcula la distancia euclideana entre los valores de citocinas que corresponden a los pacientes y los centros de cada clúster, y cada paciente es asignado al clúster más cercano. Terminada la asignación de todos los pacientes, se calcula el centroide o la media (de aquí el nombre means) de las instancias en cada clúster, y el valor resultante es considerando como el nuevo centro del clúster. El proceso se repite con los nuevos valores centrales, y la iteración continua hasta que los mismos pacientes son asignados a cada clúster en rondas consecutivas y los centros de los clusters se estabilizan y dejan de cambiar.

Por su parte, el algoritmo EM (Expectation-Maximization) adopta el procedimiento utilizado por k-means para calcular el valor de los siguientes parámetros: la media y la desviación estándar de cada cluster. Iniciando con valores aleatorios (seeds) para estos

parámetros, en un primer paso (Expectation) se calcula para cada paciente la probabilidad de pertenencia a cada cluster, y en el segundo paso (Maximization) se utilizan tales probabilidades para reestimar los parámetros, esto es, se maximiza la probabilidad de las distribuciones de los clusters a partir de los datos disponibles.

EM puede decidir el número de clusters a crear utilizando la técnica cross-validation, la cual es la más indicada para evaluar el desempeño de un algoritmo de minería cuando el número de instancias es limitado. Para ello se siguen estos pasos:

1. Se determina el número de clusters como 1.
2. El conjunto de pacientes se divide aleatoriamente en 10 partes.
3. EM se ejecuta 10 veces, en la primera se reserva la parte 1 y se ejecuta el algoritmo sobre las 9 restantes (conjunto de entrenamiento), se calcula la tasa de error utilizando la parte reservada (conjunto de prueba), se repite el proceso reservando ahora la parte 2 y ejecutando sobre las 9 restantes, y así sucesivamente.
4. Se promedian las tasas de error de las 10 ejecuciones obteniendo el error estimado total.
5. Si este error crece con respecto a su valor inicial / anterior, el número de clusters se incrementa en 1 y el algoritmo se repite a partir del paso (2).

Posteriormente, se utiliza el algoritmo J48 para inferir las reglas que caracterizan a cada uno de los clusters formados. Esta técnica genera árboles de decisión que permiten representar la clasificación de las instancias. Se utiliza una medida de cantidad de información para determinar el atributo (citocina) a colocar en la raíz del árbol, y se determina el valor de esa citocina que mejor divide a los pacientes en dos grupos (árboles binarios con atributos numéricos); para cada una de las ramas generadas se repite el proceso considerando sólo al subconjunto de pacientes que fueron incluidos en ella. El proceso termina en cada rama del árbol cuando todos sus pacientes son de la misma clase o cuando se alcanza el criterio del mínimo número de pacientes por cada nodo terminal.

❖ *Parámetros*

Se probaron distintas ejecuciones de los algoritmos EM y k-means variando sus parámetros como se indica a continuación:

Algoritmo	Parámetros
EM	<p>Máximo número de iteraciones: 100</p> <p>Número de clusters: 3 (determinado por el algoritmo)</p> <p>Mínimo valor para desviación estándar: 1.0E-6</p> <p>Valor aleatorio inicial (seed): 100</p> <p>Medida de Evaluación: Probabilidad Log (refiere la probabilidad de que los pacientes se distribuyan en los clusters formados; objetivo: aproximación a 0)</p>
J48	<p>Número mínimo de pacientes por nodo: 5</p> <p>Evaluación: área bajo la curva de ROC (objetivo: aproximación a 1), matriz de confusión</p>

❖ *Análisis estadístico.*

Con el fin de describir los valores de las variables continuas se emplearon como medidas de tendencia central, a la media o la mediana y como medidas de dispersión, la desviación estándar o los valores mínimo y máximo, dependiendo de la distribución paramétrica o no de los datos.

La comparación entre las características generales de sujetos sano y pacientes con Cáncer Pulmonar de Células no Pequeñas (CPCNP) de variables continuas se realizó con la prueba t de Student o con su alternativa no paramétrica U de Man-Whitney cuando esté indicado de acuerdo a su distribución. El análisis de variables nominales u ordinales se efectuó con prueba de χ^2 o prueba exacta de Fisher. Se consideró un valor significativo de *P* cuando éste sea ≤ 0.05 . No se ajustó por comparaciones múltiples.

En el grupo de pacientes se asoció la expresión del panel o grupos de citocinas que arrojó el análisis de minería de datos con las variables clínico-patológicas como edad, género, histología y estadio clínico. Y las variables significativas se utilizaron en un análisis multivariado de regresión logística. Se analizó la sobrevida global de pacientes de acuerdo a la mediana de la expresión del panel de citocinas con Kaplan-Meier comparado con Log-Rank. Las variables estadísticamente significativas que presentaron una *P* <0.001, fueron incluidas en análisis multivariados utilizando el modelo de Cox. Se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS (V. 20.0; SPSS, Inc., Chicago, IL).

XI. RESULTADOS.

Los pacientes y sujetos de control.

Se incluyeron un total de 110 pacientes y 25 sujetos sanos. La media de edad de los pacientes fue de 64.5 años (\pm 13.8 años), el 55,5 % eran mujeres. 21.8% de los pacientes presentaban metástasis en el sistema nervioso central y el 47.3 % de los pacientes tenían antecedentes de tabaquismo. Casi dos tercios de los pacientes (63.2 %) tuvieron una Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) puntuación \leq 1, el 83.6 % tenían histología de adenocarcinoma, y el 10 % se encontraban en estadio IIIB clínico. No hubo diferencias significativas entre los sujetos control y pacientes en el estudio, a excepción de los antecedentes de tabaquismo (12 % en el grupo control; $P < 0,001$) (TABLA 1).

Niveles de citocinas en los pacientes y sujetos de control.

En el panel de citocinas pro-inflamatorias, los pacientes con CPCNP tienen valores más altos estadísticamente significativos de IL-6 ($P < 0,001$); IL-18 ($P < 0,001$); IL-12p70 ($P < 0,001$); IL-17A ($P < 0,001$) y de IFN- γ ($P < 0,001$). En los perfiles de citocinas angiogénicos y anti-angiogénicos; sólo la IL-33 ($P < 0,003$) y la IL-29 ($P < 0,002$) fueron estadísticamente significativas, con respecto a los individuos sanos. No se encontraron diferencias significativas en el panel de citocinas anti-inflamatorias (TABLA 2 y FIGURA1).

Asociación de los niveles de citocinas con características clínicas y análisis de laboratorio.

La asociación entre el análisis de sangre, características clínico-patológicas y los niveles de citocinas se muestran en la TABLA 3 y TABLA 4. En el perfil de las citocinas pro-inflamatorias, se observa una asociación entre un alto nivel de IL -1 β con los pacientes no fumadores y los niveles más bajos de hemoglobina. Los niveles altos de IL-6 se asociaron con el sexo masculino, la edad \geq 60 años, el peor estado funcional ECOG, mayor recuento de neutrófilos y una mayor relación de plaquetas / linfocitos. Además, la IL-6 se asocia con niveles de hemoglobina bajos e hipo-albuminemia. La IL-8 se asoció con un mayor recuento absoluto de leucocitos y neutrófilos, y con menores niveles de hemoglobina.

Con respecto en el perfil de citocinas anti-inflamatorio y angiogénico, la IL-10 e IL-33 se asociaron con un menor IMC (< 20). IL-33 también se asoció con los pacientes más

jóvenes (<60 años). En las citocinas anti-angiogénicas, sólo encontramos que la interleucina 29 se asocia con los no fumadores.

Sobrevida Global de la citocinas y las características clínico-patológicas.

La mediana de seguimiento (fecha de diagnóstico hasta la fecha de último seguimiento o de defunción) de los pacientes fue de 9.1 meses con un rango de 0.6 a 37.6 meses. La mediana de sobrevida global fue de 16.4 meses [IC del 95%: 12.9 - 19.9]. El análisis univariado demostró que el género masculino, la enfermedad estable o progresión a la primera línea del tratamiento, así como el peor estado funcional (ECOG 2-3) fueron los factores asociados con peor sobrevida (TABLA 5). La única citocina asociada con una menor sobrevida global fue la IL-6 (FIGURA 2), los pacientes con niveles bajos de IL-6 (≤ 8.2 pg/ml) tuvieron una mediana de SG de 22 meses [17.2 - 26.9] vs 11.7 meses [8.0 - 15.3, $P=0.008$] en pacientes con niveles altos (>8.2 pg/ml) (TABLA 6).

Clúster de citocinas mediante el análisis de minería de datos.

Con respecto a la homogeneidad en la varianza de los niveles séricos de las citocinas, el análisis de minería permitió definir 3 grupos (clusters 1, 2, 3 de 16, 80 y 14 pacientes, respectivamente) con base en las reglas mostradas en la TABLA 7. En la FIGURA 3, se muestra el árbol arrojado por el algoritmo J48 del análisis de minería. No existieron diferencias significativas entre las características clínicas y de laboratorio entre los 3 clusters, a excepción de menores niveles de hemoglobina y albúmina en el clúster 3. (TABLA 8 Y 9).

Sobrevida Global de los Clusters de minería de datos.

De acuerdo a los grupos definidos por el análisis de minería, los pacientes del clúster 1, no alcanzaron la mediana de sobrevida, en tanto, los del clúster 2 presentaron una mediana de 16.9 meses [13.1 - 20.6] y en el clúster 3 de 5.1 meses [0.9 - 9.2 meses; $P= 0.0012$] (FIGURA 3, TABLA 10).

En el análisis multivariado se asoció a la SG de los paciente (TABLA 11), del ECOG (RR 3.63; [95%CI 1.8 - 7.4], $P<0.0001$) y los clusters formados por minería de datos (2.4; [1.4 - 4.1], $P = 0.005$).

TABLA 1. Características generales de pacientes y controles.

Variable	Sujetos Sanos	Pacientes con CPCNP	P
	N (%)	N (%)	
Edad (años)			
≤ 60	60 (15/25)	40 (44/110)	0.069
> 60	40 (10/25)	60 (66/110)	
Género			
Femenino	60 (15/25)	55.5 (61/110)	0.679
Masculino	40 (10/25)	44.5 (49/110)	
Tabaquismo			
No	88 (22/25)	52.7 (58/110)	0.001
Sí	12 (3/25)	47.3 (52/110)	
Hipertensión			
No	84 (21/25)	65.5 (72/110)	0.071
Sí	16 (4/25)	34.5 (38/110)	
Diabetes Mellitus			
No	92 (23/25)	82.7 (91/110)	0.365
Sí	8 (2/25)	17.3 (19/110)	
Histología			
Epidermoide		16.4 (18/110)	
Adenocarcinoma		83.6 (92/110)	
Estadio			
IIIB		10 (11/110)	
IV		90 (99/110)	
ECOG			
0-1		79.1 (87/110)	
2		20.9 (23/110)	
KPS			
≤70		13.6 (15/110)	
>70		86.4 (95/110)	
Metástasis SNC			
No		78.2 (86/110)	
Sí		21.8 (24/110)	

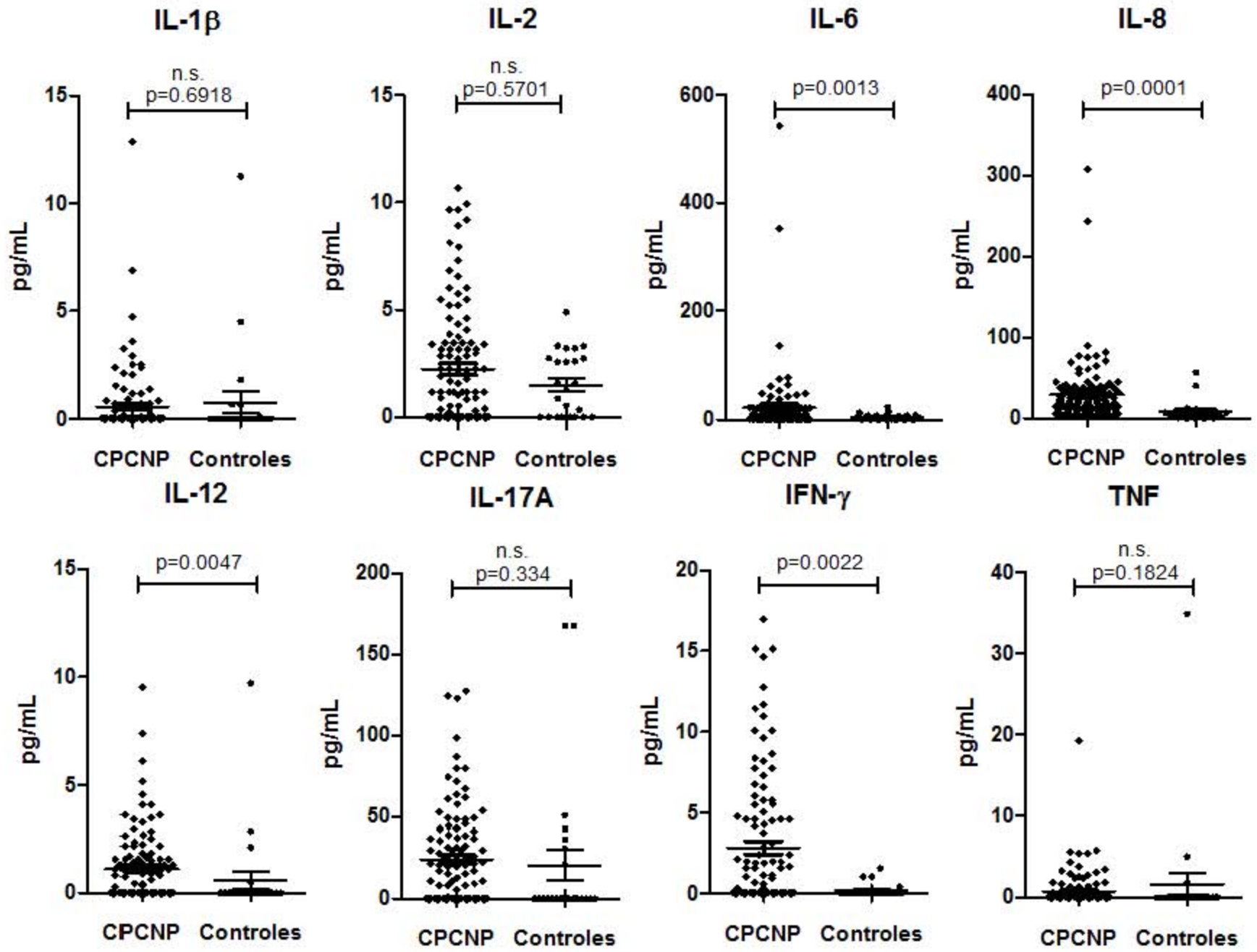
Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; KPS= Karnofsky performance score, SNC= Sistema Nervioso Central.

TABLE 2. Citocinas circulantes en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos.

Citocina	Sujetos Sanos Mediana (Rango) pg/ml	Pacientes con CPCNP Mediana (Rango) pg/ml	<i>P</i>
Pro-inflamatorias			
IL-1 β	0 (0-11.26)	0 (0-12.86)	0.691
IL-2	1.26 (0-4.89)	1.2 (0-10-65)	0.570
IL-6	4.65 (0-23.74)	9.74 (0-540.92)	0.001
IL-8	6.07 (0-56.98)	18.41 (0-307.20)	0.000
IL-12p70	0 (0-4.89)	0.3 (0-9.55)	0.0047
IL-17A	207.08 (0-2291.66)	253.38 (24.55-972.96)	0.334
IFN- γ	0 (0-1.53)	0.31 (0-16.99)	0.002
TNF	0 (0-34.86)	0 (0-19.13)	0.182
Anti-inflamatorias			
IL-4	0 (0-2.76)	0 (0-10.26)	0.614
IL-10	0 (0-12.17)	0 (0-11.78)	0.132
Pro-angiogénicas			
IL-31	1.195 (0-70.25)	1.91 (0-113)	0.830
IL-33	105.52 (5.6-1255.96)	24.02 (0-1058.4)	0.000
Anti-angiogénicas			
IL-27	207.08 (0-2291.66)	253.38 (24.55-972.96)	0.384
IL-29	38.52 (0-223.01)	0 (0-415.03)	0.004

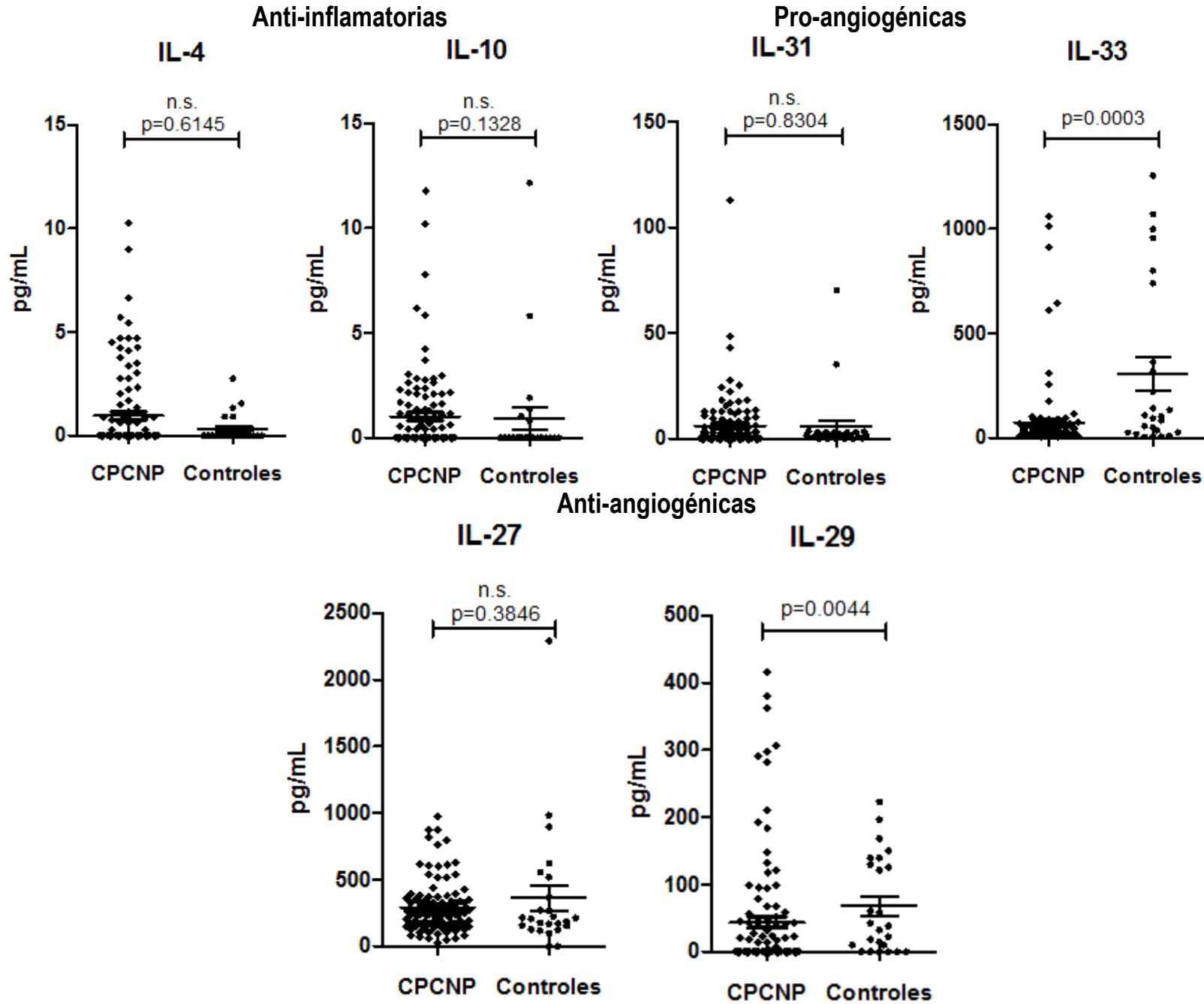
Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; IL= Interleucina, IFN- γ = Interferón gamma; TNF= tumor necrosis factor.

FIGURA 1. Citocinas circulantes en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos.
Pro-inflamatorias



Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; IL= Interleucina, IFN- γ = Interferón gamma; TNF= tumor necrosis factor.

FIGURA 1 continuación. Citocinas circulantes en pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos.



Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; IL= Interleucina.

TABLA 3. Análisis bi-variado de las citocinas.

Variable	Pro-inflamatorias							
	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-12p70	IL-17A	IFN- γ	TNF
	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)
Género								
Femenino	59.23	57.75	49.34	51.39	58.25	53.75	53.94	59.45
Masculino	50.86	52.69	63.16	60.61	52.08	57.68	57.44	50.58
<i>P</i>	0.085	0.395	0.024	0.132	0.283	0.508	0.544	0.061
Edad (años)								
≤ 60	55.15	58.67	47.03	51.64	52.95	62.26	58.39	58.36
> 60	55.73	53.39	61.14	58.08	57.20	50.99	53.58	53.59
<i>P</i>	0.905	0.381	0.023	0.300	0.467	0.062	0.411	0.321
Tabaquismo								
No	62.62	54.43	55.63	57.31	59.72	58.97	54.13	58.8
Sí	47.56	56.69	55.36	53.48	50.80	52.63	57.03	51.82
<i>P</i>	0.002	0.702	0.964	0.530	0.119	0.359	0.614	0.139
Histología								
Adenocarcinoma	55.77	57.67	55.16	53.62	57.31	56.34	55.13	56.56
Epidermoide	54.11	44.39	57.25	55.11	46.25	51.19	57.42	50.08
<i>P</i>	0.799	0.096	0.799	0.162	0.152	0.519	0.767	0.309
Estadio								
IIIB	53.50	72.64	46.64	48.95	58.86	50.82	66.5	52.18
IV	55.72	53.60	56.48	56.23	55.13	56.02	54.28	55.87
<i>P</i>	0.582	0.053	0.331	0.473	0.695	0.597	0.201	0.639
Respuesta a tratamiento								
Completa/Parcial	56.26	57.88	52.36	55.35	62.85	61.71	51.63	58.09
Estable/Progresión	55.06	57.14	57.29	55.59	51.30	51.95	57.71	54.02
<i>P</i>	0.811	0.543	0.435	0.970	0.052	0.112	0.307	0.407
ECOG								
0-1	54.32	54.63	51.11	53.07	56.30	56.10	52.82	57.13
2	59.96	58.80	72.09	64.70	52.46	53.24	65.65	49.33
<i>P</i>	0.342	0.565	0.005	0.120	0.584	0.694	0.069	0.178
KPS								
≤70	56.43	56.83	71.93	66.83	51.83	54.23	55.97	53.67
>70	55.35	55.29	52.91	53.71	56.08	55.70	55.43	55.79
<i>P</i>	0.878	0.858	0.032	0.139	0.610	0.865	0.948	0.757
IMC (kg/m²)								
≤20	64.58	56.50	57.42	62.33	57.75	56.58	62.75	66.88
>20	54.39	55.38	55.27	54.66	55.22	55.37	54.61	54.11
<i>P</i>	0.188	0.906	0.825	0.432	0.783	0.898	0.376	0.091
Derrame Pleural								
No	55.02	55.83	54.3	57.80	53.33	60.30	52.45	55.37
Sí	56.37	54.9	57.69	51.31	59.45	46.77	61.05	55.74
<i>P</i>	0.789	0.880	0.593	0.307	0.305	0.029	0.151	0.939
Metástasis SNC								
No	55.10	55.40	55.19	53.89	57.16	53.49	55.41	56.59
Sí	56.92	55.85	56.73	61.27	49.56	62.71	55.83	51.60
<i>P</i>	0.756	0.950	0.845	0.316	0.272	0.198	0.951	0.383

Abreviaturas: IL= Interleucina, IFN- γ = Interferón gamma; TNF= tumor necrosis factor; RP= Rango Promedio; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; SNC=Sistema Nervioso Central; KPS= Karnofsky performance score.

TABLA 3 continuación. Análisis bi-variado de las citocinas.

Variable	Anti-inflamatorias		Pro-angiogénicas		Anti-angiogénicas	
	IL-4	IL-10	IL-31	IL-33	IL-27	IL-29
	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)
Género						
Femenino	56.16	56.83	60.89	58.22	53.30	57.89
Masculino	54.67	53.85	48.79	52.11	58.24	52.52
<i>P</i>	0.768	0.587	0.042	0.318	0.419	0.330
Edad (años)						
≤ 60	58.65	59.06	58.57	64.32	50.55	55.42
> 60	53.40	53.13	53.45	49.62	58.80	55.55
<i>P</i>	0.307	0.287	0.397	0.018	0.183	0.981
Tabaquismo						
No	58.68	57.03	56.17	58.16	55.84	60.83
Sí	51.95	53.80	54.75	52.54	55.12	49.56
<i>P</i>	0.181	0.554	0.810	0.356	0.905	0.040
Histología						
Adenocarcinoma	54.97	56.75	53.33	54.74	55.01	55.19
Epidermoide	58.19	49.11	66.58	59.39	58.00	57.08
<i>P</i>	0.635	0.300	0.097	0.572	0.716	0.798
Estadio						
IIIB	83.36	52.86	58.05	59.64	44.18	63.23
IV	52.40	55.79	55.22	55.04	56.76	54.64
<i>P</i>	0.000	0.747	0.774	0.650	0.215	0.347
Respuesta a tratamiento						
Completa/Parcial	58.93	54.48	51.81	55.05	51.98	56.88
Estable/Progresión	53.54	56.09	57.61	55.76	57.51	54.71
<i>P</i>	0.303	0.776	0.346	0.911	0.381	0.705
ECOG						
0-1	52.91	55.17	57.30	54.56	53.05	54.22
2	65.30	56.74	48.70	59.04	64.76	60.35
<i>P</i>	0.045	0.815	0.236	0.549	0.117	0.363
KPS						
≤70	69.17	54.07	47.47	50.83	73.33	55.83
>70	53.34	55.73	56.77	56.24	52.68	55.45
<i>P</i>	0.031	0.834	0.280	0.542	0.020	0.961
IMC (kg/m²)						
≤20	48.08	79.04	56.42	78.04	59.04	42.92
>20	56.41	52.62	55.39	52.74	55.07	57.04
<i>P</i>	0.302	0.003	0.914	0.009	0.684	0.108
Derrame Pleural						
No	57.06	57.75	54.51	58.47	58.70	51.56
Sí	52.65	51.40	57.29	50.09	49.68	62.67
<i>P</i>	0.401	0.265	0.653	0.187	0.156	0.053
Metástasis SNC						
No	56.02	54.46	56.80	55.13	51.73	57.39
Sí	53.63	59.23	50.85	56.83	69.02	48.73
<i>P</i>	0.694	0.470	0.406	0.817	0.019	0.192

Abreviaturas: IL= Interleucina; RP= Rango Promedio; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; SNC=Sistema Nervioso Central; KPS= Karnofsky performance score.

TABLA 4. Factores clínicos asociados con las citocinas.

Variable	Pro-inflamatorias							
	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-12p70	IL-17A	IFN- γ	TNF
	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)
Leucocitos (miles/mm ³)								
≤8.4	56.60	59.56	51.02	48.89	59.75	55.72	56.01	59.60
>8.4	53.78	49.17	62.48	65.80	48.88	55.16	54.70	49.12
<i>P</i>	0.568	0.086	0.066	0.007	0.063	0.927	0.823	0.030
Linfocitos (miles/mm ³)								
≤1.65	53.76	54.00	56.62	53.49	58.31	54.38	55.24	56.17
>1.65	58.32	57.93	53.69	58.76	50.95	57.32	55.92	54.42
<i>P</i>	0.358	0.518	0.640	0.399	0.211	0.628	0.909	0.718
Neutrófilos (miles/mm ³)								
≤6.1	56.76	58.34	50.14	50.98	59.08	57.67	57.75	57.49
>6.1	53.01	49.91	66.07	64.42	48.43	51.22	51.05	51.57
<i>P</i>	0.463	0.178	0.013	0.037	0.078	0.302	0.269	0.235
Plaquetas (miles/mm ³)								
≤316	55.70	59.07	51.63	52.02	57.85	57.16	56.81	56.47
>316	55.23	50.71	60.68	60.17	52.35	53.28	53.74	54.20
<i>P</i>	0.924	0.162	0.141	0.185	0.341	0.516	0.597	0.634
Hemoglobina (gr/dl)								
≤14	62.09	53.36	62.28	58.75	52.99	57.39	58.66	54.92
>14	47.78	56.67	47.58	51.19	57.05	53.86	52.77	56.00
<i>P</i>	0.006	0.412	0.011	0.162	0.563	0.552	0.306	0.820
Albumina (mg/dl)								
≤3.5	58.74	50.92	74.18	63.00	62.40	58.19	56.00	57.85
>3.5	53.34	58.55	43.05	50.50	50.90	53.70	55.17	53.93
<i>P</i>	0.273	0.206	0.000	0.044	0.049	0.457	0.887	0.415
RPL								
≤209.44	54.47	59.54	49.04	55.00	53.90	56.96	54.13	55.62
>209.44	56.88	50.09	64.16	56.17	57.65	53.54	57.33	55.34
<i>P</i>	0.621	0.113	0.014	0.849	0.516	0.567	0.581	0.953
RNL								
≤4	58.58	56.21	51.91	55.46	57.01	57.12	54.99	54.97
>4	49.17	54.04	62.89	55.58	52.39	52.17	56.56	56.60
<i>P</i>	0.067	0.731	0.090	0.985	0.447	0.431	0.797	0.745

Abreviaciones: IL= Interleucina; RP = Rango Promedio; RPL= Relación Plaquetas Linfocitos; RNL=Relación Neutrófilos Linfocitos.

TABLA 4 continuación. Factores clínicos asociados con las citocinas.

Variable	Anti-inflamatorias		Pro-angiogénicas		Anti-angiogénicas	
	IL-4	IL-10	IL-31	IL-33	IL-27	IL-29
	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)	RP (pg/ml)
Leucocitos (miles/mm³)						
≤8.4	58.93	54.76	56.37	57.41	53.74	55.60
>8.4	50.15	56.65	54.14	52.52	58.24	55.34
<i>P</i>	0.088	0.735	0.712	0.433	0.470	0.962
Linfocitos (miles/mm³)						
≤1.65	54.13	54.71	53.04	54.54	57.51	58.40
>1.65	57.71	56.79	59.49	57.06	52.24	50.81
<i>P</i>	0.489	0.711	0.289	0.687	0.399	0.179
Neutrófilos (miles/mm³)						
≤6.1	57.01	54.01	56.86	58.74	54.89	55.18
>6.1	52.51	58.43	52.82	49.11	56.70	56.14
<i>P</i>	0.398	0.444	0.519	0.135	0.778	0.869
Plaquetas (miles/mm³)						
≤316	58.50	54.62	54.73	54.37	54.21	55.59
>316	51.48	56.68	56.53	57.02	57.23	55.38
<i>P</i>	0.167	0.708	0.763	0.666	0.622	0.971
Hemoglobina (gr/dl)						
≤14	58.77	55.30	53.95	51.57	59.24	56.09
>14	51.16	55.67	56.84	58.9	50.69	53.89
<i>P</i>	0.136	0.947	0.626	0.229	0.175	0.410
Albumina (mg/dl)						
≤3.5	52.40	57.49	54.40	53.25	57.94	54.82
>3.5	57.57	54.17	56.23	57.00	53.87	55.95
<i>P</i>	0.314	0.551	0.761	0.546	0.512	0.839
RPL						
≤209.44	57.01	53.68	55.39	58.87	52.75	57.75
>209.44	53.48	57.94	55.65	50.99	59.18	52.48
<i>P</i>	0.487	0.440	0.965	0.200	0.296	0.341
RNL						
≤4	56.82	55.57	56.89	58.68	55.74	58.09
>4	52.79	55.35	52.65	48.97	55.00	50.18
<i>P</i>	0.452	0.969	0.502	0.134	0.909	0.176

Abreviaturas: IL= Interleucina; RP = Rango Promedio; RPL= Relación Plaquetas Linfocitos; RNL=Relación Neutrófilos Linfocitos.

TABLA 5. Factores asociados con las sobrevida global de los pacientes.

Variable	Mediana	95% Intervalo de confianza		P
		Límite Inferior	Límite Superior	
Género				
Femenino	18.300	14.347	22.253	0.073
Masculino	12.222	2.443	22.000	
Edad (años)				
≤ 60	19.088	15.088	23.089	0.208
> 60	15.441	9.868	21.015	
Tabaquismo				
No	15.836	13.648	18.023	0.422
Sí	18.300	9.097	27.503	
Histología				
Adenocarcinoma	16.854	12.763	20.946	0.692
Epidermoide	15.014	10.545	19.484	
Estadio				
IIIB	19.088	13.864	24.312	0.698
IV	15.836	9.944	21.728	
Oligometástasis				
No	16.427	5.406	27.448	0.459
Sí	16.854	12.909	20.799	
Respuesta a tratamiento				
Completa/Parcial	25.692	15.303	36.081	0.000
Estable/Progresión	9.429	1.958	16.9	
ECOG				
1	19.088	14.076	24.101	0.000
2 y 3	4.797	0.000	12.631	
KPS				
≤70	9.166	0.000	21.638	0.014
>70	18.300	14.926	21.674	
Metástasis SNC				
No	18.3	14.87	21.73	0.095
Sí	9.429	2.137	16.721	

Abreviaturas: ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; SNC=Sistema Nervioso Central; KPS= Karnofsky performance score.

TABLA 6. Citocinas asociadas con la sobrevida global de los pacientes.

Citocina	Mediana	95% Intervalo de Confianza		P
		Límite Inferior	Límite Superior	
Pro-inflamatorias				
IL-1 β				
≤0	15.836	12.194	19.477	0.751
>0	16.885	0.000	35.002	
IL-2				
≤1.2	15.836	14.162	17.509	0.944
>1.2	19.088	9.250	28.926	
IL-6				
≤8.2	22.045	17.188	26.902	0.008
>8.2	11.696	8.048	15.344	
IL-8				
≤5.96	19.088	15.614	22.562	0.166
>5.96	15.014	5.413	24.616	
IL-12p70				
≤0	15.836	8.112	23.56	0.672
>0	16.427	9.324	23.531	
IL-17A				
≤10.85	15.014	5.431	24.598	0.221
>10.85	16.427	14.73	18.124	
IFN- γ				
≤0	9.429	0.000	22.578	0.061
>0	16.854	13.308	20.4	
TNF- α				
≤0	16.427	11.647	21.207	0.872
>0	22.045	0.056	44.035	
Anti-inflamatorias				
IL-4				
≤0	18.300	14.266	22.333	0.838
>0	15.441	9.575	21.308	
IL-10				
≤0	15.014	8.367	21.661	0.311
>0	16.854	12.681	21.028	
Pro-angiogénicas				
IL-31				
≤1.79	19.088	15.838	22.338	0.772
>1.79	15.014	9.618	20.411	
IL-33				
≤28.39	12.222	6.764	17.679	0.241
>28.39	19.318	14.051	24.585	
Anti-angiogénicas				
IL-27				
≤242.1	16.854	12.457	21.252	0.861
>242.1	12.222	5.411	19.033	
IL-29				
≤0	15.836	11.566	20.106	0.446
>0	16.427	7.183	25.671	

Abreviaturas: IL= Interleucina.

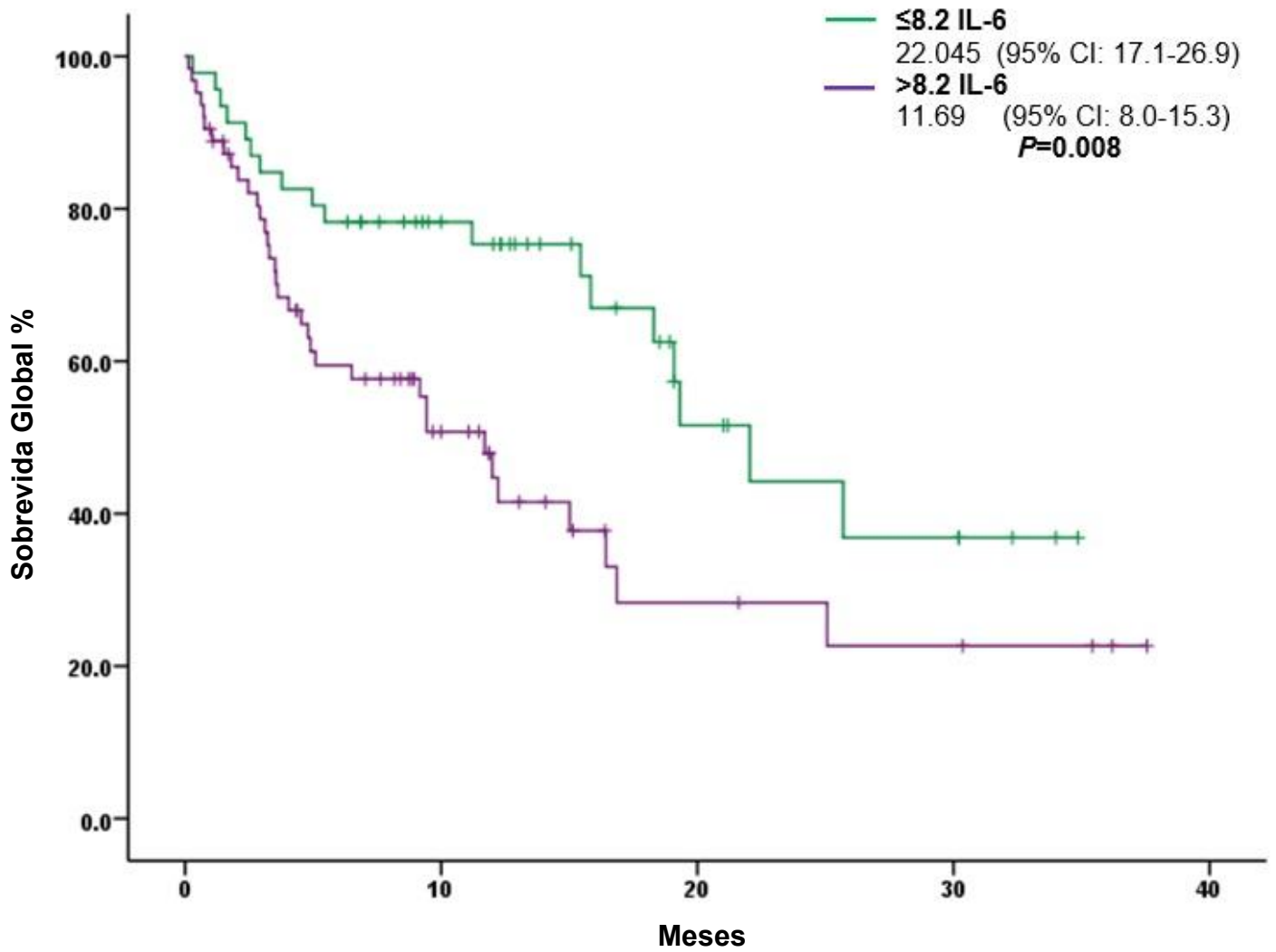


FIGURA 2. Sobrevida Global (SG) en meses, de los pacientes con CPCNP con niveles bajos de IL-6 (≤ 8.2 pg/ml).

TABLA 7. Clusters de citocinas generados mediante el análisis del algoritmo J48.

Citocina (pg/ml)	Regla 1	Regla 2	Regla 3	Regla 4	Regla 5
Clúster 1 n=16					
IL-6	>43.33	≤43.33	≤43.33		
IL-29	>132.6	>55.69	≤55.69		
IL-4			>0.91		
IL-2		≤2.22			
IL-27			>436.11		
IL-8					
IL-12p70		≤1.65			
Número de pacientes	1	12	3		
Clúster 2 n=80					
IL-6	≤43.33	≤43.33	≤43.33	≤43.33	≤43.33
IL-29	>55.69	>55.69	≤55.69	≤55.69	≤55.69
IL-4			≤0.91	>0.91	>0.91
IL-2	>2.22	≤2.22			
IL-27				≤436.11	≤436.11
IL-8				≤15.96	>15.96
IL-12p70		>1.65			>5.18
Número de pacientes	6	2	63	8	1
Clúster 3 n=14					
IL-6	>43.33	≤43.33			
IL-29	≤132.6	≤55.69			
IL-4		>0.91			
IL-2					
IL-27		≤436.11			
IL-8		>15.96			
IL-12p70		≤5.18			
Número de pacientes	11	3			

Abreviaturas: IL= Interleucina.

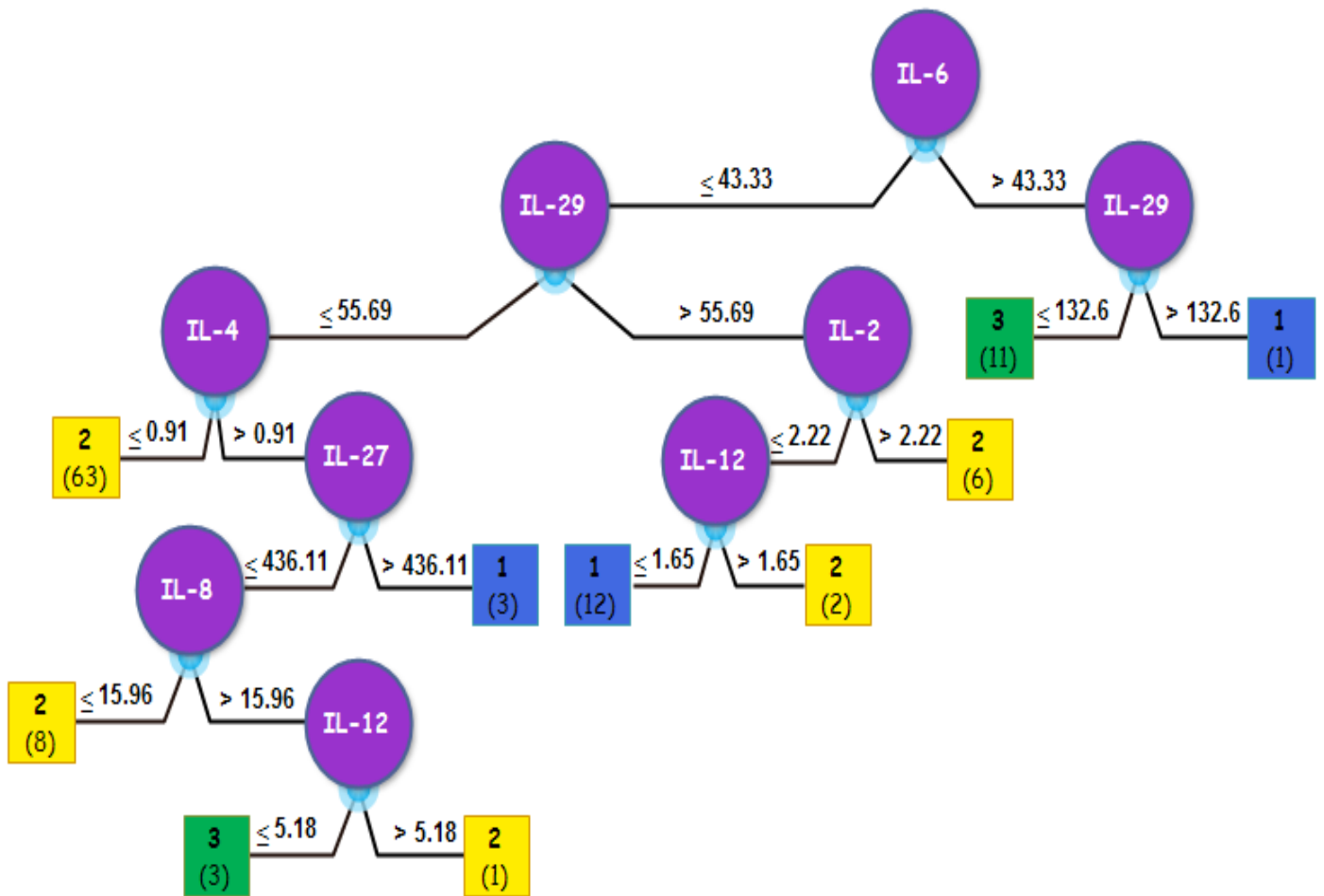


FIGURA 2. Árbol de decisión de los pacientes con CPCNP generado por el algoritmo J48.

TABLA 8. Características generales de los Clúster de Minería de Datos.

Variable	Cluster 1 N (%)	Cluster 2 N (%)	Cluster 3 N (%)	P
Edad (años)				
≤ 60	37.5 (6/16)	41.2 (33/80)	35.7 (5/14)	0.904
> 60	62.5 (10/16)	58.8 (47/80)	64.3 (9/14)	
Género				
Femenino	68.8 (11/16)	55 (44/80)	42.9 (6/14)	0.359
Masculino	31.2 (5/16)	45 (36/80)	57.1 (8/14)	
Tabaquismo				
No	75 (12/16)	47.5 (38/80)	57.1 (8/14)	0.124
Sí	25 (4/16)	52.5 (42/80)	42.9 (6/14)	
Hipertensión				
No	62.5 (10/16)	65 (52/80)	71.4 (10/14)	0.865
Sí	37.5 (6/16)	35 (28/80)	28.6 (4/14)	
Diabetes Mellitus				
No	75 (12/16)	83.3 (67/80)	85.7 (12/14)	0.665
Sí	25 (4/16)	16.2 (13/80)	14.3 (2/14)	
Histología				
Adenocarcinoma	75 (12/16)	85 (68/80)	85.7 (12/14)	0.599
Epidermoide	25 (4/16)	15 (12/80)	14.3 (2/14)	
ECOG				
1	68.8 (11/16)	82.5 (66/80)	71.4 (10/14)	0.351
2 y 3	31.2 (5/16)	17.5 (14/80)	28.6 (4/14)	
KPS				
≤70	18.8 (3/16)	10 (8/80)	28.6 (4/14)	0.142
>70	81.2 (13/16)	90 (72/80)	71.4 (10/14)	
Estadio Clínico				
IIIB	6.2 (1/16)	11.2 (9/80)	7.1 (1/14)	0.773
IV	93.8 (15/16)	88.8 (71/80)	92.9 (13/14)	
Oligometástasis				
No	12.5 (2/16)	16.2 (13/80)	7.1 (1/14)	0.651
Sí	87.5 (14/16)	83.8 (67/80)	92.9 (13/14)	
Metástasis SNC				
No	81.2 (13/16)	78.8 (63/80)	71.4 (10/14)	0.788
Sí	18.8 (3/16)	21.2 (17/80)	28.6 (4/14)	

Abreviaturas: CPCNP= Cáncer De pulmón de células no pequeñas; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; KPS= Karnofsky performance score, SNC= Sistema Nervioso Central.

TABLA 9. Factores Clínicos asociados con los clúster de Minería de Datos.

Variable	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	P		
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
Leucocitos (millón/mm ³)	8.15 (3.4/16)	8.7 (3.3/29.2)	7.75 (4.5/22.9)	0.9999	0.9999	0.9999
Linfocitos (millón/mm ³)	1.75 (0.3/2.9)	2.2 (0.6/17)	1.75 (0.5/3.8)	0.9999	0.9999	0.9318
Neutrófilos (millón/mm ³)	5.7 (0.8/13.7)	6.25 (0.4/71.8)	6.25 (3.2/16.8)	0.7762	0.7762	0.9132
Plaquetas (millón/mm ³)	289 (125/584)	428 (22.1/801)	357.5 (233/625)	0.7779	0.7371	0.7779
Hemoglobina (gr/dl)	13.9 (9.9/18)	14.4 (10.10/19.9)	13.35 (9.5/16.2)	0.3681	0.3681	0.0524
Albumina (mg/dl)	3.65 (1.7/4.3)	3.5 (1.7/4.4)	2.75 (2.2/3.9)	0.9999	0.0086	0.0079
RPL	171.4 (73.53/863.3)	202.4 (8.5/773.3)	283.2 (88.24/580)	0.9999	0.7691	0.4018
RNL	3.175 (0.67/24.33)	4.025 (0.27/39.71)	4.745 (1.33/13)	0.9999	0.1797	0.3795
ECOG	1 (1-2)	1 (1-3)	1 (1-3)	0.7564	0.9999	0.9681

Abreviaturas: IL= Interleucina; RPL= Relación Plaquetas / Linfocitos; RNL= Relación Neutrófilos / Linfocitos; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group.

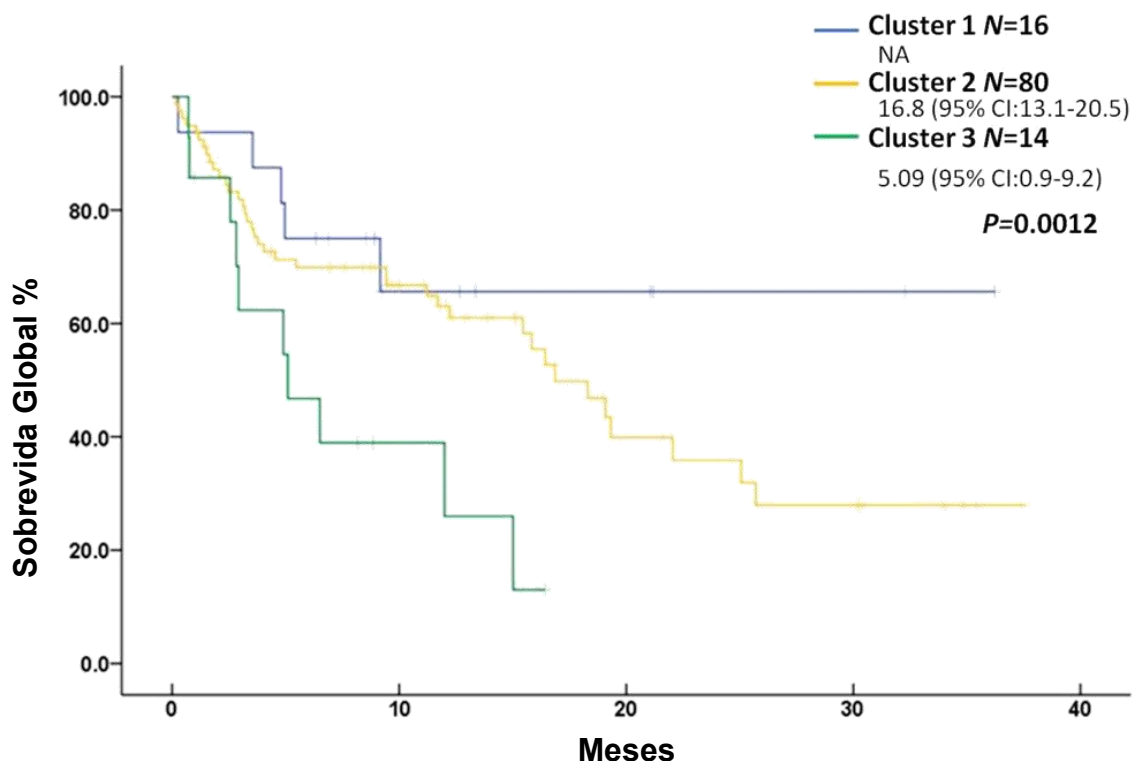


FIGURA 3. Sobrevida Global (SG) en meses de los clusters de los pacientes con CPCNP.

TABLA 10. Clusters de Minería de Datos con la sobrevida global de los pacientes.

Cluster	Mediana	95% Intervalo de Confianza		P
		Límite Inferior	Límite Superior	
1	0	0	0	
2	16.854	13.121	20.587	0.012
3	5.092	0.936	9.249	

TABLA 11. Análisis multivariado de la sobrevida global.

	RR	95% Intervalo de Confianza		P
		Límite Inferior	Límite Superior	
IL-6	1.291	0.682	2.446	0.433
Clusters Minería de Datos	2.204	1.275	3.811	0.005
Genero	1.094	0.607	1.969	0.766
ECOG	3.598	1.917	6.753	0.0001
Metástasis SNC	1.055	0.512	2.174	0.885

Abreviaturas: RR= Riesgo Relativo; ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group; SNC= Sistema Nervioso Central

XII. DISCUSIÓN.

El microambiente tumoral es un sistema dinámico y complejo, donde múltiples interacciones tienen lugar. Estas interacciones favorecen la remodelación de tejidos y alteraciones metabólicas. Así como el reclutamiento de células inmunes que promueven la liberación de diferentes moléculas efectoras inmunomoduladoras [79, 80].

Las citocinas, son secretadas por todas las células, incluyendo a las células malignas, las cuales promueven respuestas celulares, como la inflamación, angiogénesis, la proliferación, migración, y la hematopoyesis [81, 82, 83]. Además de que desarrollan un papel en la manifestación de síntomas [84], calidad de vida [85] y los resultados clínicos [86] en pacientes con cáncer. Esto se refiere a que, tanto el microambiente tumoral como el sistema inmune y las redes de proteínas (citocinas), son sistemas complejos que tienen un cierto nivel de variedad interna, lo que les permite funcionar y adaptarse a su entorno durante la enfermedad.

Las reglas que determinan la dinámica del cáncer como un sistema complejo, no suelen ser simples. Sin embargo, predecir el comportamiento del sistema a largo plazo, resulta casi imposible en la mayoría de las ocasiones. Es muy complicado obtener resultados teóricos sobre el modelo y que tengan una coherencia y explicación biológica. No obstante, el método de análisis por minería de datos, proporciona una herramienta adecuada para el análisis de sistemas complejos [87].

En muchos casos, la simulación por ordenador es la única forma de obtener progreso en la comprensión de un fenómeno, utilizando las herramientas de análisis matemático, como la minería de datos, para explicar el modelo por medio de simulación mediante un ordenador como una forma de experimentación. Los datos y gráficas generados por medio de este tipo de análisis, proporcionan claves para entender el problema y ayudan en la búsqueda de resultados teóricos rigurosos. La búsqueda de intuiciones y la comprensión cualitativa sobre el sistema pueden servir de guía para encontrar pruebas matemáticas sobre el sistema estudiado. Por lo que la relación entre simulación y análisis es un punto a resaltar. Siendo la teoría, experimentación y simulación, los tres pilares fundamentales en el entendimiento del cáncer como sistema biológico complejo.

En este estudio, nuestro objetivo fue desarrollar un perfil basado en un inmunoensayo múltiple de amplio espectro para describir el equilibrio entre el microambiente tumoral entre mensajeros angiogénicos e inflamatorios. Por lo tanto, evaluamos los niveles en plasma de 14 citocinas. Las citocinas cuantificadas fueron elegidas bajo la correlación que existe con ambas actividades biológicas (angiogénesis, inflamación). De esta manera, mediante la descripción de microambiente tumoral bajo este enfoque, podríamos profundizar en el

conocimiento de una mejor comprensión del desarrollo de CPCNP y para señalar nuevos posibles desencadenantes clave en su progresión, especialmente para las etapas III y IV de la enfermedad.

Usando el algoritmo EM, encontramos una asociación significativa entre 7 citocinas y los resultados clínicos en pacientes con CPCNP avanzado. Estas citocinas, fueron: IL-6, IL29, IL-4, IL-2, IL-27, IL-8 e IL-12p70, que más tarde, se definen en tres grupos de pacientes, que fueron asociados con diferentes resultados clínicos y el pronóstico de acuerdo con un árbol de decisión.

Además, basado en el análisis de minería de datos nuestros resultados sugieren una correlación dependiente de la dosis entre el rendimiento citocinas. Por lo tanto, estas normas pueden resaltar diferentes umbrales que regulan sus actividades biológicas.

De hecho, estudios previos han demostrado que diferentes concentraciones de IL-6 pueden tener diferentes efectos debidos a la existencia de conformaciones del receptor de alta afinidad [88]. Nuestros resultados mostraron que la IL-6 fue la única citocina asociada con una peor SG. Según otros estudios los niveles séricos elevados de IL-6 se asocia a un mal ECOG, la malnutrición y la disminución de la albúmina y la transferrina [89, 90, 91, 92]. Del mismo modo, se encontró que los pacientes con altos niveles de IL-6 se asociaron con los varones, la edad avanzada, baja hemoglobina y albúmina. Del mismo modo, la interleucina-6 juega un papel en la regulación de IFN- γ , respuesta inmune y la reacción de fase aguda [89, 93]. Además, la IL-6 estimular la formación de hepcidina, un péptido hormonal que inhibe el flujo de hierro a partir de los enterocitos, hepatocitos y macrófagos al plasma, conllevando a la inhibición de la eritropoyesis [93]. Esto explica nuestra asociación entre IL-6 y la anemia.

IL-29 ha sido recientemente identificada y definida dentro de la familia de receptores de citocinas clase II (IL-10, tipo I de IFN) [94, 95]. El efecto anti-proliferativo de IL-29 en el CPNM es crucial debido a su papel en la regulación de la expresión de p21 y la inducción la apoptosis [96]. Zitzmann *et al* [97] han informado que la IL-29 induce la fosforilación de STAT1, STAT2 y STAT3 disminuyendo la proliferación celular, y promoviendo la inducción de la apoptosis. Un ejemplo de la interacción entre IL-6 e IL-29 se observa claramente en nuestro árbol de decisiones. Sabemos que los pacientes con altos niveles de IL-6 tenían un pronóstico pobre, sin embargo, un subgrupo de pacientes con niveles altos de IL-6 y niveles altos de IL-29 se define el cluster 1, que tiene un mejor pronóstico a pesar de sus altos niveles de IL-6.

IL-2 aumenta el comportamiento de las células NK mediante la estimulación de las células LAK (células asesinas activadas por linfocinas), que inhiben el crecimiento del tumor. Esto puede explicar por qué los niveles más altos de IL-2 ($> 2,22$ pg / ml), en relación con los niveles más altos de IL-29 (> 55.69 pg / ml) y menores niveles de IL-6 ($\leq 43,33$) favorecen una respuesta anti-angiogénica y una efectiva respuesta pro-

inflamatoria del huésped hacia el desarrollo tumoral. Esto luego de subrayar, qué los pacientes definidos dentro del cluster 2 tenían una mejor supervivencia global en comparación con el cluster 3.

Los resultados muestran que los niveles séricos de IL-4 ($> 0,91$ pg / ml) asociado con niveles más elevados de IL-27, que es conocida por su actividad anti-angiogénica, a pesar de tener niveles más bajos de IL-29, se asocia con cluster 1 de mejor pronóstico. También se sabe que la IL-4 inhibe a la IL-6 [98], como esta última inhibe la interleucina 2. Por lo tanto, la inhibición a priori de IL-6 por IL-4 aumenta la síntesis de IL-27. Por lo tanto, la acción combinada de la IL-4 e IL-27 promueve un equilibrio de citocinas anti-inflamatorias y anti-angiogénicas, favoreciendo una mayor supervivencia en los pacientes en el cluster 1, como se muestra en la Figura 1. Del mismo modo, se ha descrito que la IL-27 junto con la IL-12 estimula la síntesis de IFN- γ por linfocitos, que tiene efecto antitumoral [99, 100]. En todos los pacientes la IL-12 no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia global, sin embargo de acuerdo a nuestro árbol de decisión podría definir el buen y el mal pronóstico. Los pacientes con niveles más bajos de IL-12 junto con niveles altos de IL-8, niveles más bajos de IL-27, niveles más altos de IL-4 y niveles bajos de la IL-29 e IL-6 tenían un peor pronóstico. Sin embargo, los pacientes con altos niveles de IL-12, niveles bajos de IL-2, niveles altos de IL-29 y niveles bajos de IL-6 pertenecen a un grupo de buen pronóstico. Esto refleja la importancia y la complejidad de las interacciones de diferentes niveles de citocinas que resultan en efectos paradójicos.

Este es el primer estudio con un enfoque de sistema complejo que evalúa la interacción de citocinas circulantes mediante análisis de minería de datos, en pacientes con CPCNP avanzado y que se obtienen subgrupos de pacientes. Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista *Annals of Oncology* (doi:10.1093/annonc/mdu549) (Anexo 1).

El análisis de minería de datos fue altamente eficiente debido a su nivel de correlación y ningún paciente fue excluido de cualquiera de los tres grupos. Esto sugiere que es muy probable que el algoritmo pueda ser validado en cohortes futuras. El estudio tiene limitaciones; primero, se incluyeron pacientes con histología escamosa y no escamosa que ahora, sabemos que tiene diferente perfil molecular, diferentes resultados clínicos y el posiblemente diferente comportamiento inmunológico. El tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande como para el análisis de la minería de datos; sin embargo, este informe justifica la realización de un estudio más amplio para cada subtipo histológico para confirmar los subgrupos identificados.

La evaluación clínica dentro de un enfoque basado en un perfil múltiple de citocinas realiza varias fortalezas. En primer lugar, se puede traducir fácilmente a otros contextos clínicos oncológicos (es decir, la anemia relacionada con el cáncer, melanoma, cáncer renal y leucemia). Por otra parte, con base en un perfil múltiple de citocinas, podríamos definir pacientes de alto riesgo con mayor precisión para discriminar de manera más eficiente a los pacientes que se pueden beneficiar de una terapia específica.

XIII. CONCLUSIONES.

El cáncer como sistema biológico complejo, representa un complejo conjunto de acciones en un ambiente activo y dinámico. Este complejo de acciones es a la vez sincrónico, diacrónico y recursivo. Se describe por su organización proyectiva en niveles; cada nivel asegura la conjunción de las funciones de transformación recursivas de auto-producción, de auto-mantenimiento y de auto-relación. Esta organización de sistema complejo del cáncer se articula por la conjunción de señales propias y del hospedero.

El abordaje de temas de salud como los son las enfermedades desde la complejidad; es el desafío que debemos asumir, en que el pensamiento complejizador y las herramientas de modelización sistémica deberán mostrar toda su potencialidad.

En suma, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte prematura y evitable. Ya sea que se promueva la detección temprana como un objetivo de salud pública, aun carecemos de un método de tamizaje. Los datos emergentes sugieren que las terapias dirigidas son lo más utilizado en el contexto molecular. A pesar de esto, la mayoría de los ensayos aleatorizados en fase III continúan siendo diseñados para poblaciones de pacientes no seleccionados. Por lo que la incorporación de biomarcadores validados científicamente y diseñados racionalmente en los ensayos clínicos, que comprueben o apoyen un diagnóstico y una terapia dirigida, ofrecen una manera prometedora de avanzar en la inmunoterapia con éxito.

Por medio de ensayos de detección múltiple de analitos solubles (Citocinas) por citometría de flujo y ELISA, se realizó la detección y cuantificación de 14 citocinas en plasma de pacientes con CPCNP. Los datos de las cuantificaciones se correlacionaron con las características clínico-patológicas de los pacientes.

Por medio del análisis por minería de datos se logró clasificar a los pacientes en distintos clusters de acuerdo a los patrones de secreción de citocinas de los pacientes; lo cual nos permitió observar y evaluar asociaciones pronosticas de sobrevida en los distintos clusters formados.

En conclusión, existe una red compleja de moléculas (citocinas) inflamatorias, anti-inflamatorias, angiogénicas y anti-angiogénicas que pueden resultar en efectos paradójicos en pacientes con CPCNP. En los cuales diferentes perfiles de citocinas pueden definir el pronóstico de los pacientes y pueden representar biomarcadores potenciales.

XIV. REFERENCIAS.

- 1) Cantero W. (n.d.). Los sistemas complejos biológicos, su desarrollo y su evolución, 1–16.
- 2) McCulloch WS. 1965. Embodiments of mind. MIT Press, Cambridge.
- 3) Kresh, J. Y. (n.d.). Integrative systems view of life : perspectives from general systems thinking, 1192, 3–29.
- 4) Cuestas, E. (2011); análisis de la variabilidad de los sistemas complejos utilizando entropía aproximada 67(2), 77–80.
- 5) Tarride, M. (1995). “Complexity and complex systems”. Historia, ciencia, salud – Manguinhos, II (1); 46-66.
- 6) Bertalanffy, L. Von. (1987). Teoría general de los sistemas. Editorial Fondo de cultura económica.
- 7) Laszlo E, ed. 1972. The relevance of general systems theory. George Braziller, New York.
- 8) Von Bertalanffy L. 1968. General system theory. George Braziller, New York.
- 9) Wiener N. 1948. *Cybernetics or control and communication in the animal and the machine*. Hermann Editions in Paris. MIT Press, Cambridge (2nd ed. 1961, Wiley & Sons, New York).
- 10) Ashby R. 1956. *An introduction to cybernetics*. Methuen, New York.
- 11) Koestler A, Smythes JR, eds. 1968. *Beyond reductionism*. Hutchinson, London.
- 12) Simon HA. 1969. The sciences of the artificial. MIT Press, Cambridge.
- 13) Emmanuel, R. (1982). Caos y orden, 1–17.
- 14) Miramontes, O. (1999). Los sistemas complejos como instrumentos de conocimiento y transformación del mundo. En Ramirez. S (editor.), *Perspectivas sobre la teoría de sistemas*. Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades, UNAM-Siglo XXI, México.
- 15) Uninorte, S., Norte, U., & D, J. E. M. (2008). Nanobioética , nanobiopolítica y nanotecnología *Nanobioethic , nanobiopolitics and nanotechnology*, 24, 140–157.
- 16) Noble D. 2000. Modelling the heart: insights, failures and progress. *Bioessays* 24:1155–1163.
- 17) Kolmogorov AN. Dokl Akad Nauk SSSR 1968;119:861- 864.
- 18) Sinai Ya G. Dokl Akad Nauk SSSR 1959;124:768-771.
- 19) Oseledets VI. (1968). Trna Moscow Math Soc;19:197- 231.
- 20) Pincus SM. (1991) Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc Nat Acad Sci USA*;88:2297- 2301.
- 21) Pincus SM. (1995). Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. *Chaos*;5:110-117.
- 22) Pincus SM. (2001). Assessing serial irregularity and its implications for health. *Ann NY Acad Sci*;954:245-267.
- 23) Pincus SM, Cummings TR, Haddad GG. (1993); Hearth rate control in normal and aborted –SIDS infants. *Am J Physiol*;264:638-646.

- 24) Veldman RG, Frolich M, Pincus SM, Veldhuis JD, Roelfsema F. (1998); Patients with Cushing's disease secrete adrenocorticotropin and cortisol jointly more asynchronous than healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*;83:688-692.
- 25) Engoren M. (1998). Approximate entropy of respiratory rate and tidal volume during weaning from mechanical ventilation. *Crit Care Med*;26:1817-1823.
- 26) Burnsed J, Quigg M, Zanelli S, Goodkin HP (2011). Clinical Severity, Rather Than Body Temperature, During the Rewarming Phase of Therapeutic Hypothermia Affect Quantitative EEG in Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Clin Neurophysiol*.
- 27) Varela M, Jimenez L, Farina R. (2003) Complexity analysis of the temperatura curve: new information from body temperatura. *Eur J Appl Physiol*;89:230-237.
- 28) Cadavid, L. F., & Ph, D. (2010). La evolución de sistemas complejos : el caso del sistema inmune en animals. *14*, 247–254.
- 29) Segel, L. A. (n.d.). Multiple sensors can improve system performance : immunology and multiple-organ regulation, 425–436.
- 30) Larocca, L., Calafat, M., Roca, V., Ramhorst, R., & Leirós, P. (2008). Biochemical clues to the neuroimmune cross-talk, 197–212.
- 31) Patiño, J.F. (n.d.). Oncología, caos, sistemas complejos adaptativos y estructuras disipativas. *Revista de cirugía, Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá.* 1–9.
- 32) Patiño JF. (2000) Caos y complejidad: las ciencias del siglo XXI. *Lecturas de Nutrición* 6 (3):35-42.
- 33) Patiño JF. (2002). *Computador, Cibernética e Información. Prólogo de JF Isaza. Bogotá Panamericana Editorial Ltda.*
- 34) Lewin R. (1995). *Complejidad. El Caos como Generador del Orden. Metatemas 41. Tusquets Editores SA. Barcelona.*
- 35) Buchman, T. G. (n.d.). Physiologic failure : multiple organ dysfunction syndrome, 63110, 631–640.
- 36) Goldberger AL, Amaral LA, Hausdorff JM, Ivanov PCh, Peng CK, Stanley HE. 2002. Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 19(suppl 1):2466–2472.
- 37) Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. 1973. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* 178(2):117–122.
- 38) Baue AE. 1975. Multiple, progressive, or sequential systems failure: a syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 110(7):779–781.
- 39) Cook R, Cook D, Tilley J, Lee K, Marshall J. 2001. Canadian Critical Care Trials Group: multiple organ dysfunction: baseline and serial component scores. *Crit Care Med* 29(11):2046–2050.
- 40) Wuchty, S. (n.d.). NETWORKS, 5259, 165–181.
- 41) Flajolet M, Rotondo G, Daviet L, Bergametti F, Inchauspe G, Tiollais P, Transy C, Legrain P. 2000. A genomic approach to the hepatitis C virus. *Gene* 242:369–379.

- 42) Rain J-C, Selig L, DeReuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J. 2001. The protein–protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409:211–215.
- 43) Gavin A, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick J, Michon AM. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415:141–147.
- 44) Oltvai ZN, Barabási A-L. 2002. Life's complexity pyramid. *Science* 298:763–764.
- 45) Karp PD, Riley M, Saier M, Paulsen I, Paley S, Pellegrini-Toole A. 2000. The EcoCyc and MetaCyc databases. *Nucleic Acids Res* 28:56–59.
- 46) Fell D, Wagner A. 2000. The small world of metabolism. *Nature Biotech* 189:1121–1122.
- 47) Walhout A, Sordella R, Lu X, Hartley J, Temple G, Brasch M, Thierry-Mieg N, Vidal M. 2000. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* 287:116–122.
- 48) Wagner A. 2000. Mutational robustness in genetic networks of yeast. *Nature Genet* 24:355–361.
- 49) Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. 1999. From molecular to modular cell biology. *Nature* 402:C47–C52.
- 50) Kohn K. 1999. Molecular interaction map of mammalian cell-cycle control and dna repair systems. *Mol Biol Cell* 10:2703–2734.
- 51) Jeong H, Oltvai ZN, Barabási A-L. 2003. Prediction of protein essentiality based on genomic data. *ComPlexUs* 1:19–28.
- 52) Borish, L. C. & Steinke, J. W. 2. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, S460–S475 (2003).
- 53) Steinke, J. W. & Borish, L. 3. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, S441–S445 (2006).
- 54) Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867 (2002).
- 55) Prehn, R. T. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 176, 170–171 (1972).
- 56) Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211–217 (2005).
- 57) De Visser, K. E., Eichten, A. & Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Rev. Cancer* 6, 24–37 (2006).
- 58) Mantovani, A. Cancer: inflammation by remote control. *Nature* 435, 752–753 (2005).
- 59) Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nature Rev. Cancer* 4, 540–550 (2004).
- 60) Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555 (2002).
- 61) Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545 (2001).
- 62) Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev. Cancer* 5, 263–274 (2005).

- 63) Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A. & Ochoa, A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol. Today* 20, 158–160 (1999).
- 64) Tan, T. T. & Coussens, L. M. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 209–216 (2007).
- 65) Tosi, M. F. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 241–249 (2005).
- 66) Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol.* 5, 987–995 (2004).
- 67) Janeway, C. A. Jr & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216 (2002).
- 68) Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A., Steffensen, K. D. & Mor, G. Cancers take their Toll — the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 27, 225–233 (2008).
- 69) Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G. & Pellat-Deceunynck, C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20, 1130–1137 (2006).
- 70) He, W. *et al.* TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol. Immunol.* 44, 2850–2859 (2007).
- 71) Kelly, M. G. *et al.* TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66, 3859–3868 (2006).
- 72) Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. & Mantovani, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2007).
- 73) Garcia, K. C., Teyton, L. & Wilson, I. A. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 369–397 (1999).
- 74) Gutcher, I. & Becher, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.* 117, 1119–1127 (2007).
- 75) Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138–146 (1996).
- 76) Coffman, R. L. Origins of the Th1–Th2 model: a personal perspective. *Nature Immunol.* 7, 539–541 (2006).
- 77) Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunol.* 6, 1133–1141 (2005).
- 78) Wang, H. Y. & Wang, R. F. Regulatory T cells and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 217–223 (2007).
- 79) Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867, 2002.
- 80) Pollard JW: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* 4:71–78, 2004
- 81) Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology* 2007;37(Suppl. 1):S34–45.

- 82) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140:883–99.
- 83) Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* 2009;8:3267–73.
- 84) Relationship of Cytokines to Symptom Distress and Symptom Clusters Among Non-small-cell Lung Cancer Patients Receiving Gefitinib Treatment: A Pilot Study Shu-Yi Wang 1, Chun-Ming Tsai 2, 3, Chia-Chin Lin 4 * *J Exp Clin Med* 2014;6(2):50e56
- 85) Arrieta, Ó., Núñez-Valencia, C., Reynoso-Eraza, L., Alvarado, S., Flores Estrada, D., Angulo, L. P., & Oñate-Ocaña, L. F. (2012). Health-related quality of life in patients with lung cancer: Validation of the Mexican-Spanish version and association with prognosis of the EORTC QLQ-LC13 questionnaire. *Lung Cancer*, 77, 205–211. doi:10.1016/j.lungcan.2012.02.005.
- 86) Songur N, Kuru B, Kalkan F, Ozdilekcan C, Cakmak H, Hizel N. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori* 2004;90:196–200
- 87) Mantovani A, Pierotti M a: Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer letters* 267:180–1, 2008.
- 88) Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al: The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. [Internet]. *Biochimica et biophysica acta* 1813:878–88, 2011
- 89) Songür N, Kuru B, Kalkan F, et al: Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. [Internet]. *Tumori* 90:196–200, 2004
- 90) Suh S-Y, Choi YS, Yeom CH, et al: Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. [Internet]. *Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 21:3071–7, 2013
- 91) Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez-Hernández E, et al: Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: Randomised trial. [Internet]. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* , 2014
- 92) Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez E, et al: Association of Nutrition Parameters Including Bioelectrical Impedance and Systemic Inflammatory Response With Quality of Life and Prognosis in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *Nutrition and Cancer* 64:526–534, 2012
- 93) Kishimoto T: The biology of interleukin-6. *Blood* 74:1–10, 1989
- 94) Witte K, Witte E, Sabat R, et al: IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 21:237–251, 2010.
- 95) Hubbard T, Barker D, Birney E, et al: The Ensembl genome database project. *Nucleic acids research* 30:38–41, 2002
- 96) Fujie H, Tanaka T, Tagawa M, et al: Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small cell lung cancer. *Cancer Science* 102:1977–1990, 2011.

- 97) Zitzmann K, Brand S, Baehs S, et al: Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 344:1334–1341, 2006
- 98) Neurath MF, Finotto S: IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 22:83–89, 2011
- 99) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 170:827–845, 1989.
- 100) Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al: Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *The Journal of experimental medicine* 173:869–879, 199

Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters non-small-cell lung cancer patients according to prognosis

L. Barrera^{1,2,†}, E. Montes-Servín^{1,†}, A. Barrera³, L. A. Ramírez-Tirado⁴, F. Salinas-Parra¹, J. L. Bañales-Méndez^{1,5}, M. Sandoval-Ríos⁶ & Ó. Arrieta^{2,4*}

¹Laboratory of Integrative Immunology, National Institute of Respiratory Diseases Ismael Cosío Villegas, Mexico City; ²Postgraduate Unit, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City; ³Computer Engineering Department, Mexico's Autonomous Technological Institute, Mexico City; ⁴Laboratory of Experimental Oncology and Thoracic Oncology Unit, National Institute of Cancer, Mexico City; ⁵Laboratory of Immunology, National Institute of Cardiology, Mexico City; ⁶Division of Natural Sciences, Regional Center for Teacher Development and Educational Research (CRFDIES) of Sonora, Mexico City, Mexico.

Received 13 July 2014; revised 10 October 2014 and 30 October 2014; accepted 21 November 2014

Background: Immunoregulatory cytokines may play a fundamental role in tumor growth and metastases. Their effects are mediated through complex regulatory networks. Human cytokine profiles could define patient subgroups and represent new potential biomarkers. The aim of this study was to associate a cytokine profile obtained through data mining with the clinical characteristics of patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC).

Patients and methods: We conducted a prospective study of the plasma levels of 14 immunoregulatory cytokines by ELISA and a cytometric bead array assay in 110 NSCLC patients before chemotherapy and 25 control subjects. Cytokine levels and data-mining profiles were associated with clinical, quality of life and pathological outcomes.

Results: NSCLC patients had higher levels of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-12p70, IL-17a and interferon (IFN)- γ , and lower levels of IL-33 and IL-29 compared with controls. The pro-inflammatory cytokines IL-1b, IL-6 and IL-8 were associated with lower hemoglobin levels, worse functional performance status (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG), fatigue and hypoxemia. The anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-33 were associated with anorexia and lower body mass index. We identified three clusters of patients according to data-mining analysis with different overall survival (OS; 25.4, 16.8 and 5.09 months, respectively, $P = 0.0012$). Multivariate analysis showed that ECOG performance status and data-mining clusters were significantly associated with OS (RR 3.59, [95% CI 1.9–6.7], $P < 0.001$ and 2.2, [1.2–3.8], $P = 0.005$).

Conclusion: Our results provide evidence that complex cytokine networks may be used to identify patient subgroups with different prognoses in advanced NSCLC. These cytokines may represent potential biomarkers, particularly in the immunotherapy era in cancer research.

Key words: non-small-cell lung cancer, cytokines, data-mining analysis, prognosis, biomarkers

Introduction

Lung cancer continues to be the leading cause of cancer-related mortality both worldwide and in the USA [1]. In Mexico, lung cancer was the leading cause of cancer-related deaths in 2012, accounting for 7608 deaths. The majority of patients present with advanced-stage disease at the time of diagnosis [2].

The inflammatory response is regulated by cytokines, which exert pleiotropic and redundant effects on growth promotion, differentiation and activation in normal cells as well as in chronic diseases such as cancer [3].

Depending on the microenvironment, cytokines have either pro-inflammatory activity (mainly cytokines secreted by Th-1 helper cells [4, 5]) or anti-inflammatory activity (cytokines secreted by Th-2 helper cells [6]).

Moreover, the interplay between inflammation and angiogenesis is also mediated largely by growth factors and cytokines, particularly interleukins (ILs) [7]. Thus, because the control of cytokine production is highly complex and multifactorial, their effects are mediated through multiple regulatory networks. This complexity suggests that only integral knowledge of the role of different cytokines may help to describe the pathogenesis of cancer instead of a single cytokine assessment [8]. There is accumulating evidence that chronic inflammation is involved in the development and progression of cancer [6]. Recent evidence has shown that circulating inflammatory cytokines are associated with survival in early-stage lung cancer [9]. However, to our knowledge, this is the first study that describes a cytokine profile and its relationship with clinical characteristics in patients with NSCLC.

The progressive increase in clinical data is opening the possibility of performing large-scale studies aimed to

*Correspondence to: Dr. Óscar Arrieta, Thoracic Oncology Unit, National Institute of Cancer, San Fernando 22 Sección XVI, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico. Tel: +52-55-56280400; Fax: +52-55-5513151223; E-mail: ogar@unam.mx

†Both authors contributed equally to this work.

discover correlations between new research data and related diseases. For these reasons, many relational databases have implemented techniques for data mining, defined as 'the non-trivial extraction of implicit previously unknown and potentially useful information about data' [10].

The aim of this study was to associate the plasma levels of several cytokines with clinical characteristics and prognosis in patients with advanced NSCLC. Our assays measured pro-inflammatory, anti-inflammatory, anti-angiogenic and angiogenic cytokines.

Methods

study population

We carried out a prospective study of NSCLC patients (N = 110) enrolled from May 2011 to November 2012. The inclusion criteria were: adult patients (>18 years), disease stage IIIB/IV, histopathological confirmation of NSCLC, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status of 0–2, no prior cytotoxic platinum-based chemotherapy and eligible to receive chemotherapy (supplementary Methods S1, available at Annals of Oncology online). All subjects signed a written informed consent form. This study was approved by the Institutional Review Board and Ethics Committee [INCAN (011/018/ICI-CV/683)] from the National Cancer Institute. Health-related quality of life was assessed by the EORTC QLQC30 and QLQ-LC13 validated in their Mexican–Spanish versions [2]. Blood samples of healthy subjects (N = 25) were obtained from the Blood Transfusion Center bank, and information concerning age, gender, smoking history and comorbidities was recorded.

materials

Cytokine analysis. Plasma levels of the cytokines IL-31, IL-33, IL-27 and IL-29 were quantified by the ELISA technique (Biolegend, San Diego, CA, USA). The cytokines IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF), IL-4 and IL-10 were quantified using a cytometric bead array assay (BD, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired using a FACS Aria II Flow Cytometer (BD, Biosciences, Mexico) and analyzed with the FCAP Array software V. 3.0 (Soft Flow, Pecs, Hungary).

data analysis

Statistical analysis. Baseline characteristics of patients, response rates and cytokine levels were compared using a t or Mann–Whitney U-test and the χ^2 test. Overall survival (OS) curves were estimated and compared with the Kaplan–Meier method, and the log-rank or Breslow tests, respectively. Significance and borderline P-values ≤ 0.1 were included in the multivariate analysis. Statistical significance was determined as $P \leq 0.05$ with a two-sided test. All data were analyzed using the SPSS software package version 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Data-mining analysis. We applied clustering techniques to divide patients into natural groups (clusters) according to the values of several cytokines. The groups formed may be unique (each patient belonging to one group) or probabilistic (each patient belonging to one group with a

certain probability). We explored the latter option by using the Expectation–Maximization (EM) algorithm [11]. Therefore, we begin with random values (seeds) to estimate two parameters: the mean and SD for each cluster. Subsequently, we applied the J48 algorithm to infer rules that characterize 115 each of the clusters formed and generate decision trees [11]. Weighted measures of the attributes (cytokines) were placed in the root of the tree according to the cytokine value that best divides patients into two groups. For each branch, the process was repeated by considering only the subset of patients who were included in it, until all patients are from the same class, or when the minimum number threshold of patients for each terminal node was reached (supplementary Methods S2, available at Annals of Oncology online).

Results

patients and control subjects

A total of 110 patients were included, their mean age was 58.5 years (± 16.4 years) and 57.5% were female. Central nervous system metastases were present in 12.5% of the patients, and 42.5% of the patients had smoking history; 85% had an ECOG score of ≤ 1 , 87.5% had adenocarcinoma histology and 12.5% were in clinical stage IIIB. There were no significant differences between control subjects and patients at baseline, except for smoking history ($P < 0.010$; supplementary Table S1, available at Annals of Oncology online).

cytokine levels in patients and control subjects

Among the pro-inflammatory cytokine panel, NSCLC patients had statistically significant higher values for IL-6 ($P < 0.001$), IL-8 ($P < 0.001$), IL-12p70 ($P < 0.001$), IL-17A ($P < 0.001$) and IFN- γ ($P < 0.001$). Among angiogenic and anti-angiogenic cytokine profiles, only IL-33 ($P = 0.003$) and IL-29 ($P = 0.002$) were significantly lower. No significant differences were found among the anti-inflammatory cytokines (Table 1; supplementary Figure S1a and b, available at Annals of Oncology online).

association of cytokine levels with clinical characteristics, laboratory tests and quality of life

The association of clinical–pathological characteristics, blood tests and quality of life with cytokine levels is shown in Table 2 as well as supplementary Table S2 and Table S3, available at Annals of Oncology online. Among the pro-inflammatory cytokines, higher levels of IL-1b were found to be associated with non-smokers, lower hemoglobin levels and a higher tendency toward fatigue. High plasma IL-6 levels were associated with male gender, age ≥ 60 years, worse ECOG performance status, higher neutrophil counts and a higher platelet/lymphocyte ratio. In addition, IL-6 was associated with low hemoglobin levels, hypoalbuminemia and hyporexia. IL-8 was associated with higher absolute counts of leucocytes and neutrophils and lower levels of hemoglobin. We found an association between higher IL-8 levels and fatigue. With regard to the anti-inflammatory cytokines, IL-4 was associated with a worse performance status and hyporexia. IL-10 and IL-33 were associated with a lower body mass index (< 20).

Table 1. Circulating cytokines in lung cancer patients and control subjects

Cytokine	Control subjects Median (range) pg/ml	NSCLC patients Median (range) pg/ml	<i>P</i> value
Pro-inflammatory			
IL-1b	0 (0-11.26)	0 (0-12.86)	0.689
IL-2	1.26 (0-4.89)	1.2 (0-10.65)	0.568
IL-6	4.65 (0-23.74)	9.74 (0-540.92)	0.001
IL-8	6.07 (0-56.98)	18.41 (0-307.20)	0.000
IL-12p70	0 (0-4.89)	0.3 (0-9.55)	0.005
IL-17A	207.08 (0-2291.66)	253.38 (24.55-972.96)	0.033
IFN- γ	0 (0-1.53)	0.31 (0-16.99)	0.002
TNF	0 (0-34.86)	0 (0-19.13)	0.181
Anti-inflammatory			
IL-4	0 (0-2.76)	0 (0-10.26)	0.612
IL-10	0 (0-12.17)	0 (0-11.78)	0.132
Pro-angiogenic			
IL-31	1.195 (0-70.25)	1.91 (0-113)	0.828
IL-33	105.52 (5.6-1255.96)	24.02 (0-1058.4)	0.000
Anti-angiogenic			
IL-27	207.08 (0-2291.66)	253.38 (24.55-972.96)	0.383
IL-29	38.52 (0-223.01)	0 (0-415.03)	0.004

NSCLC= Non-small cell lung cancer; IL= interleukin; IFN-g= interferon gamma; TNF= tumor necrosis factor.

cytokine clusters by clinical data mining

By employing a 10-fold cross-validation technique, the EM algorithm separated patients into three clusters based on their plasma levels of cytokines: cluster 1 with 16 patients, cluster 2 with 80 patients and cluster 3 with 14 patients.

According to the J48 algorithm, the set of rules that characterize each of the clusters formed was inferred as a decision tree, which is illustrated in Figure 1. Regarding cluster 1, for example, patients may fit into one of three rules: (i) patients with high levels of IL-6 and high levels of IL-29, (ii) patients with low levels of IL-6, high levels of IL-29 and low levels of IL-2 and IL-12, (iii) patients with low levels of IL-6 and IL-29, but high levels of IL-4 and IL-27. Supplementary Table S4, available at Annals of Oncology online summarizes all the different rules characterizing the three clusters and the corresponding cytokine level values.

No significant differences were found for the clinical and laboratory characteristics between the three clusters, except for lower levels of hemoglobin and albumin in patients belonging to cluster 3 (supplementary Table S5 S7, available at Annals of Oncology online).

overall survival

The median follow-up of patients was 9.1 months, with a range between 0.6 and 37.6 months. The median OS was 16.4 months [95% CI 12.9–19.9]. Male gender, no objective response to firstline treatment and a worse performance status (ECOG 2–3) were associated with a lower OS (supplementary Table S8, available at Annals of Oncology online). IL-6 was the only cytokine associated with a lower OS: 22 months [17.2–26.9] versus 11.7 months [8.0–15.3, $P = 0.008$] in patients with higher levels of IL-6 (>8.2 pg/ml; supplementary Table S9, available at Annals of Oncology

online and Figure 2A). According to the data-mining group definition, patients in cluster 1 did not reach the median survival, while those in cluster 2 demonstrated a median survival of 16.8 months [13.1–20.5] and those in cluster 3 had a median survival of 5.09 months [0.9–9.2 months; $P = 0.0012$; Figure 2B]. In multivariate analysis, only ECOG and data-mining cluster groups were associated with poor prognosis (RR 3.59, [95% CI 1.9–6.7], $P < 0.001$ and 2.2, [1.2 3.8], $P = 0.005$; supplementary Table S10, available at Annals of Oncology online).

Discussion

There is evidence for the association of pro- and anti-inflammatory cytokines with lung cancer risk independent of histologic type or smoking status [5]. We found higher levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 and IFN- γ) in NSCLC patients compared with the control group and lower levels of pro- and anti-angiogenic cytokines (IL-33 and IL-29). Several studies have shown the association of these cytokines with symptoms, quality of life and clinical outcomes in NSCLC patients [2, 12, 13]. This chronic inflammation could mediate a critical role in the suppression of apoptosis, angiogenesis, proliferation, invasion and metastases [14, 15]. The tumor microenvironment is a dynamic and complex system where multiple interactions take place. These interactions enhance tissue remodeling and metabolic alterations and affect both the recruitment of immune cells and the release of different immunomodulatory effectors [6, 16]. Thus, data-mining analysis methods provide a suitable tool for the analysis of this complex system [17]. In this study, we described the balance between angiogenic and inflammatory

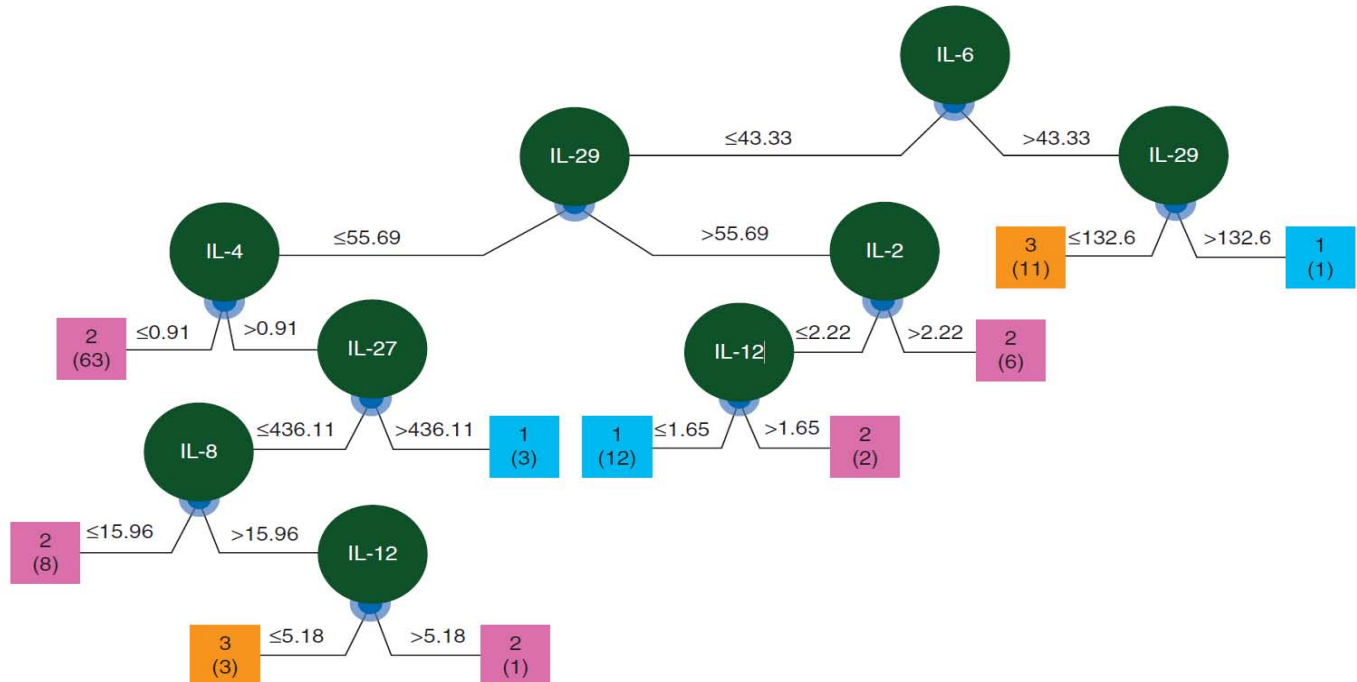


Figure 1. Decision tree for patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) generated by the J48 algorithm. Rules that characterize each of the clusters formed were inferred as a decision tree. This technique generates decision trees that can represent the classification of instances. A measure of amount of information to determine the attribute (cytokine) to be placed in the root of the tree is used, and the value of this cytokine that best divides patients into two groups (binary trees with numerical attributes) is determined; for each of the branches, the process generated by considering only the subset of patients who were included into it is repeated. The process ends in each branch of the tree when all patients are of the same class or when the criterion of the minimum number of patients for each terminal node is reached.

In addition, based on the data-mining analysis, our results suggest a dose-dependent correlation among cytokine performance. Therefore, these rules may highlight different thresholds regulating the biological activities of cytokines. In fact, previous studies have shown that different concentrations of IL-6 could have different effects due to the existence of high-affinity receptor conformations [18]. Our results showed that IL-6 was the only cytokine associated with a lower OS. According to other studies, high serum IL-6 levels are associated with a poor ECOG score, malnutrition and decreased albumin and transferrin [13, 19, 20]. Similarly, we found that patients with high levels of IL-6 were associated with lower hemoglobin and albumin levels.

Likewise, IL-6 plays a role in the regulation of IFN- γ , immune response and acute-phase reaction [13, 20]. In addition, IL-6 stimulates the formation of hepcidin, a hormonal peptide that inhibits iron efflux from enterocytes, hepatocytes and macrophages to plasma, driving inhibition of erythropoiesis [20].

IL-29 has been recently identified and defined within the class II cytokine receptor ligand family [21]. The anti-proliferative effect of IL-29 in NSCLC is crucial due to its role in the upregulation of p21 and induction of apoptosis [22]. Zitzmann et al. [23] have reported that IL-29 induces phosphorylation of STAT thereby decreasing cell proliferation and inducing apoptosis. An example of the interaction between IL-6 and IL-29 is clearly observed in our decision tree. We know that patients with high levels of IL-6

had a poor prognosis. However, a patient subgroup with higher levels of IL-6 and high levels of IL-29 defines cluster 1, and members of this cluster have a better prognosis despite their high levels of IL-6.

IL-2 boosts the natural killer compartment by stimulating lymphokine-activated killer cells (LAK cells), which inhibit tumor growth. This may explain why higher levels of IL-2 (>2.22 pg/ml) in conjunction with higher levels of IL-29 (>55.69 pg/ml) and lower levels of IL-6 (≤ 43.33) favored an anti-angiogenic and an effective pro-inflammatory host response toward tumor development. These data underscore why patients defined within cluster 2 had a better OS compared with those in cluster 3.

Our results show that serum levels of IL-4 >0.91 pg/ml were associated with higher levels of IL-27, which is known for its anti-angiogenic activity, and despite having lower levels of IL-29, members of cluster 1 tend to have a better prognosis. Additionally, it is known that IL-4 inhibits IL-6 [24], which is capable of inhibiting IL-27. Therefore, a priori inhibition of IL-6 by IL-4 will increase the synthesis of IL-27. Thus, the combined action of IL-4 and IL-27 promotes an anti-inflammatory and anti-angiogenic-circulating cytokine balance favoring longer survival in patients in cluster 1, as shown in Figure 1. Likewise, it has been described that IL-27 and IL-12 function together to stimulate the synthesis of IFN- γ by lymphocytes, which has an anti-tumor effect [25]. In all patients, IL-12 had no effect on OS.

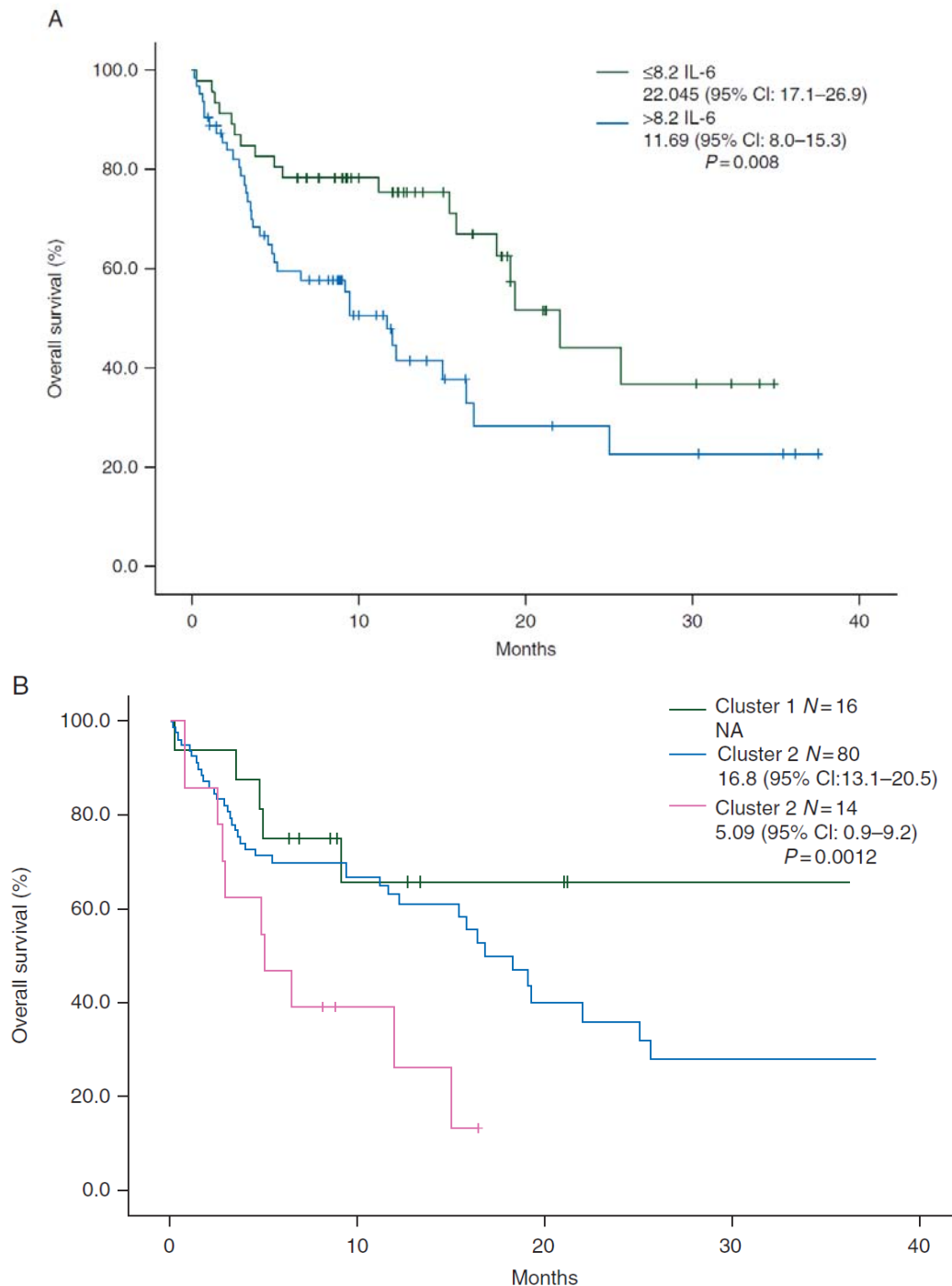


Figure 2. Kaplan–Meier overall survival (OS, in months) curve for interleukin (IL)-6. This cytokine was associated with a lower OS: 22 months [17.2–26.9] versus 11.7 months [8.0–15.3, $P = 0.008$] in patients with higher levels of IL-6 (>8.2 pg/ml). (A) Kaplan–Meier OS (in months) curve for patients with NSCLC clustered by the J48 algorithm. Cluster 1 did not reach the median survival, cluster 2 had 16.8 [13.1–20.5] months and cluster 3 had 5.09 months [0.9–9.2] months; $P = 0.0012$ (B).

However, according to our decision tree, IL-12 could define good and worse prognosis. Patients with lower levels of IL-12 together with high levels of IL-8, lower levels of IL-27, higher levels of IL-4, lower levels of IL-29 and lower levels of IL-6 had a worse prognosis. However, patients with high levels of IL-12, lower levels of IL-2, high levels of IL-29 and lower levels of IL-6 belong to a good prognosis group. This

reflects the relevance and the complexity of the interactions of different cytokine levels resulting in paradoxical effects.

To our knowledge, this is the first study to assess the interaction of circulating cytokines via data-mining analysis in advanced NSCLC patients and obtain patient subgroups.

Our data-mining analysis was highly efficient due to its correlation level, and no patient was excluded from any of the three groups. This suggests that it is highly probable that our algorithm may be validated in future cohorts. However, our study has limitations. First, we included patients with squamous and non-squamous histology that we now know have different molecular profiles, clinical outcomes and possible immunological behavior. Also, in order to address the applicability of our method, we may need further independent validation datasets to apply the same methods. Nonetheless, a clinical assessment within an approach based on a multicytokine profile has several strengths. It can be easily translated to other clinical-oncological settings (e.g. melanoma and renal cancer). Moreover, based on a multicytokine profile, we might define high-risk patients more accurately to more efficiently discriminate patients who may benefit from a specific therapy.

Conclusion

In conclusion, a complex network exists between inflammatory, anti-inflammatory, angiogenic and anti-angiogenic cytokines that may result in paradoxical effects in patients with NSCLC. Different cytokine profiles may define patient prognosis and may represent potential biomarkers, particularly in the immunotherapy era in cancer research.

Acknowledgements

The authors thank to the graduate program in Medicine and Complexity (<http://medicinaycomplejidad.org>) for their support and fruitful discussions during the development of this work.

Funding

This study was supported in part by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT- Mexico 161599 to LB and 87453 to OA). Bristol-Myers Squibb, Mexico and BD Biosciences, Mexico provided reagents as a donation, with no interference in the trial design and results analysis.

Disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 9–29.
2. Arrieta Ó, Núñez-Valencia C, Reynoso-Erazo L et al. Health-related quality of life in patients with lung cancer: validation of the Mexican-Spanish version and association with prognosis of the EORTC QLQ-LC13 questionnaire. *Lung Cancer* 2012; 77: 205–211.
3. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S460–S475.
4. Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* 2008; 43: 374–379.
5. Shiels MS, Pfeiffer RM, Hildesheim A et al. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(24): 1871–1880.
6. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 2860–2867.

7. Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 2005; 96: 15–26.
8. Costantini S, Capone F, Guerriero E, Castello G. An approach for understanding the inflammation and cancer relationship. *Immunol Lett* 2009; 126: 91–92.
9. Bodelon C, Polley MY, Kemp TJ et al. Circulating levels of immune and inflammatory markers and long versus short survival in early-stage lung cancer. *Ann Oncol* 2013; 24: 2073–2079.
10. Ahmed K, Al Emran A, Jesmin T et al. Early detection of lung cancer risk using data mining. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 595–598.
11. Witten IH, Frank E, Hall MA. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*. 3rd edition. Morgan Kaufmann, 2011. Ch. 4 (pp. 99–107, 138–141), Ch. 5 (pp. 152–154, 163–180), Ch. 6 (pp. 192–203, 287–289).
12. Bower JE, Lamkin DM. Inflammation and cancer-related fatigue: mechanisms, contributing factors, and treatment implications. *Brain Behav Immun* 2013.
13. Songür N, Kuru B, Kalkan F et al. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori* 2004; 90: 196–200.
14. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007.
15. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and Cancer. *Cell* 2010; 140: 883–899.
16. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 71–78.
17. Mantovani A, Pierotti MA. Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett* 2008; 267(2): 180–181.
18. Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez-Hernández E et al. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. *Clin Nutr* 2014.
19. Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez E et al. Association of nutrition parameters including bioelectrical impedance and systemic inflammatory response with quality of life and prognosis in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a prospective study. *Nutr Cancer* 2012; 64: 526–534.
20. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1–10.
21. Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 237–251.
22. Fujie H, Tanaka T, Tagawa M et al. Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 1977–1990.
23. Zitzmann K, Brand S, Baehs S et al. Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 1334–1341.
24. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 83–89.
25. Chan SH, Perussia B, Gupta JW et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991; 173: 869–879.
26. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(5): 878–888.

KEY MESSAGE

Human cytokine profiles could define patient subgroups and represent new potential biomarkers. The aim of this study was to associate a cytokine profile obtained through data mining with the clinical characteristics of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Our results provide evidence that complex cytokine networks may be used to identify patient subgroups with different prognoses in advanced NSCLC.