



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**PROYECTO DE TESIS PARA ESPECIALIDAD MEDICA EN
ONCOLOGIA MEDICA**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Título de tesis:

“Determinación de LKB1 como biomarcador pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que reciben metformina en combinación con quimioterapia”

PRESENTA:

Diego Armando Díaz García
Residente de tercer año de Oncología Médica
Instituto Nacional de Cancerología

TUTOR:

Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez
Instituto Nacional de Cancerología



Ciudad de México, agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

CONTENIDO		PAGINA
I	ABREVIATURAS	3
II	ANTECEDENTES	4
III	JUSTIFICACION	5
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA - HIPOTESIS - OBJETIVOS	5
V	MATERIAL Y METODOS - UNIVERSO DE ESTUDIO - METODOLOGIA - ANALISIS ESTADISTICO - SELECCION DE POBLACION	6
VI	CONSIDERACIONES ETICAS	7
VII	RESULTADOS	8
VIII	DISCUSION	10
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	12
X	ANEXOS	13

I. ABREVIATURAS

CPCNP, Cáncer de pulmón de células no pequeñas
LKB1, Liver kinase B1
STK11, serine/threonine protein kinase 11
AMPK, mitogen activated protein kinase
mTOR, mammalian Target Of Rapamycin
EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico
KRAS, Kirsten Ras Sarcoma virus
mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1
AMP, adenosin monofosfato
ADP, adenosin difosfato
ROS1, ROS proto-oncogene 1
HER2, Human epidermal growth factor receptor 2
BRAF, B-Raf proto-oncogene
RET, RET proto-oncogene
MET, MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group
IHQ, inmunohistoquímica
SG, supervivencia global
SLP, supervivencia libre de progresión
TR, tasas de respuesta
AT, actividad tumoral

II. ANTECEDENTES

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y representa el 13% de total neoplasias. En México, es 5° en frecuencia y 1° en mortalidad, con 7.5 y 6.7 casos por 100 000 habitantes, respectivamente, con letalidad del 90%. La histología de células no pequeñas (CPCNP) corresponde al 80-85% del total de neoplasia primarias de pulmón. (1) Se estima que al momento del diagnóstico hasta el 65% se presentan con enfermedad localmente avanzada o metastásica, sin embargo, esta cifra puede ser aún mayor en países en vías de desarrollo. En México, menos del 2% se detectan en etapas tempranas. (2) La supervivencia a 5 años es pobre, incluso en etapas tempranas, siendo desde 43% en etapa I, hasta un 2% en etapa IV, lo que implica una necesidad de mejoras en el tratamiento y la búsqueda de biomarcadores. (3)

LKB1 (Liver kinase B1), también conocido como STK11 (serine/threonine protein kinase 11), se localiza en el cromosoma 19p13.3, y se encuentra expresado en varios tejidos, y tiene un papel fundamental como regulador de homeostasis de energía celular, polarización celular e incremento en apoptosis en respuesta a estrés metabólico. (4) Funciona como gen supresor de tumor, e interactúa con la proteína cinasa activada por AMP (AMPK, mitogen-activated protein kinase) que bloquea la transducción de señales a través de la vía de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) para inhibir el crecimiento celular, por lo tanto, la pérdida de función de LKB1 conduce a la activación de la vía mTOR y la tumorigénesis. Se ha asociado a diferentes tipos de cáncer esporádico, así como al síndrome de Peutz-Jeghers, de herencia autosómica dominante. (5) En cáncer de pulmón, se ha identificado como la tercera mutación más frecuente en adenocarcinomas. Ambos alelos de LKB1 están inactivados somáticamente en 30%, y más comúnmente dentro del CPCNP con mutación en KRAS, en comparación al asociado a mutaciones en EGFR. Similar a KRAS, las mutaciones en LKB1 se asocian a tabaquismo. (4)

Se desconoce el rol de la mutaciones por pérdida de función en LKB1, en cuanto a su función como un biomarcador predictivo o pronóstico. En un estudio, se encontró pérdida de expresión por IHQ hasta en 30% de CPCNP con mutación en KRAS, siendo más frecuente en fumadores vs no fumadores; asimismo, la pérdida concomitante de LKB1 y KRAS, se asoció a un mayor número de sitios metastásicos al momento del diagnóstico, mayor incidencia de enfermedad extratorácica, y metastasis en SNC, pero sin diferencia significativa en cuanto a supervivencia en CPCNP etapa IV con mutación de KRAS y pérdida de LKB1. (4) Otro estudio retrospectivo, demostró que en pacientes con CPCNP tratados con quimioterapia más bevacizumab, el estado de LKB1 débil o negativo, valorado por IHQ, no se asociaba con beneficio de añadir bevacizumab, mientras que los pacientes con expresión moderada o intensa, presentaban una reducción significativa en el riesgo de muerte al recibir bevacizumab. (6)

La metformina es un antidiabético oral, del grupo de las biguanidas, descubierto en Europa en 1950. (7) Actúa disminuyendo la gluconeogénesis hepática y mejora la captación de glucosa en los tejidos periféricos. En modelos tumorales, se han descrito

efectos inhibitorios y proapoptóticos, ya sea sola (8-10) o en combinación con quimioterapia. (11,12) Las células con deficiencia de LKB1, son incapaces de detectar apropiadamente el estrés metabólico, por hiperactivación de mTORC1 y alteración en vías de señalización como AMPK, la cual regula el crecimiento celular, mantiene homeostasis de energía y controla metabolismo de ácidos grasos. Las biguanidas, incrementan el AMP y ADP intracelular se unen a la unidad gamma reguladora de AMPK y desencadenan la fosforilación de AMPK dependiente de LKB1. Schakelford et al, demostraron mayores niveles de apoptosis y reducción de carga tumoral, posterior al tratamiento con fenformina, en CPCNP con deficiencia de LKB1, así como retraso en la progresión tumoral e incremento en supervivencia, en modelos murinos. (13)

La quimioterapia basada en platinos, es uno de los pilares del tratamiento en cáncer de pulmón de células no pequeñas, en todas la etapas de la enfermedad. En etapa temprana, es utilizada en adyuvancia; en enfermedad localmente avanzada, se emplea de forma preoperatoria, o como tratamiento definitivo en algunos casos; y en enfermedad metastásica es el tratamiento estándar en pacientes sin mutaciones para las cuales se identifique una terapia blanco (EGFR, ALK, ROS1, entre otras). (2)

III. JUSTIFICACION

Se desconoce el rol de la mutaciones por pérdida de función en LKB1, en cuanto a su función como un biomarcador predictivo o pronóstico. En cáncer de pulmón, se ha identificado como la tercera mutación más frecuente en adenocarcinomas.

A través de este estudio, se evaluará el valor pronóstico de la determinación de LKB1, en relación al uso de quimioterapia y metformina, así como factores clínico-patológicos asociados a supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, tanto a nivel mundial como en México, con una letalidad de 90% aproximadamente. La supervivencia global a 5 años es del 18% de forma general, pero en enfermedad metastásica es menor del 5%. En CPCNP, que representa 80-85% del total, se han identificado diversas alteraciones moleculares (EGFR, ALK, ROS1, HER2, BRAF, RET, MET) durante la última década, para lo cual existen terapias blanco (o dirigidas) que han cambiado el curso de la enfermedad y el pronóstico de estos pacientes, sin embargo, en aproximadamente el 45% no se identifican dichas alteraciones, o en 25% con alteraciones (KRAS, por ejemplo) sin terapia blanco aprobada hasta el momento. (14)

La metformina ha sido utilizada en el tratamiento de la diabetes mellitus desde hace varias décadas. Estudios preclínicos han demostrado o sugerido cierto efecto antitumoral de este fármaco, aunque en CPCNP existe poca evidencia.

En CPCNP, en histología adenocarcinoma, LKB1 se ha encontrado como la tercer mutación más frecuente. El papel pronóstico o predictivo de LKB1 en CPCNP es poco claro, y hasta el momento no se encuentran opciones terapéuticas para dichas alteraciones.

La determinación de LKB1 en CPCNP, y su asociación pronóstica con el tratamiento con quimioterapia y metformina, no ha sido estudiada, motivo por el cual se desarrolla el presente estudio.

IV.1 HIPOTESIS

Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con pérdida de la función de LKB1, que reciben quimioterapia y metformina, tienen peor pronóstico, con menor supervivencia global y libre de progresión, así como en menores tasas de respuesta, en comparación con los que mantienen función preservada de LKB1.

IV.2 OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la supervivencia global de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, que reciben tratamiento con quimioterapia y metformina, de acuerdo a la función del gen supresor LKB1, determinado por inmunohistoquímica.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Evaluar la supervivencia libre de progresión en pacientes con CPCNP tratados con metformina y quimioterapia de acuerdo a la función del gen supresor LKB1.
2. Evaluar las tasas de respuesta en pacientes con CPCNP tratados con metformina y quimioterapia de acuerdo a la función del gen supresor LKB1.
3. Identificar variables clínico-patológicas asociadas a la pérdida de función de LKB1.

V. MATERIAL Y METODOS

V.1 UNIVERSO DE ESTUDIO Y DISEÑO

Se realizará un estudio retrospectivo, de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, con cáncer de pulmón de células no pequeñas de histología adenocarcinoma, confirmado por histología, tratados con quimioterapia y metformina.

V.2 METODOLOGIA

Se determinará la expresión de LKB1 mediante inmunohistoquímica, mediante la clona HPA017254 (Sigma®), el proceso de IHQ se especifica en anexo 1. Se analizará la correlación de la expresión de LKB1 con la supervivencia global, definido como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la muerte; así como características clínico-patológicas, supervivencia libre de progresión (tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la progresión o muerte) y tasas de respuesta objetiva (respuesta completa y respuesta parcial).

Se utilizarán las líneas celulares A549 con baja expresión LKB1, HCC827 mutación en EGFR delección exon 19 (obtenidas de la ATCC), se mantendrán en RPMI-1640 con SFB al 10% en una incubadora a 37°C, y una atmósfera de 5% de CO₂. Se sembrarán células en placas de 96 pozos, confluencia de 10(5) células, se administrará tratamiento con cisplatino como unidroga (en 5 concentraciones diferentes) y en combinación con metformina (las concentraciones de ambos, se especifican en anexo 2), y posterior a tratamiento se dejan en incubación durante 72 horas, se realiza ensayo MTT para evaluar viabilidad celular.

V.3 ANALISIS ESTADISTICO

Para variables clínicas y demográficas se utilizará estadística descriptiva y medidas de tendencia central. Prueba de X² o prueba exacta de Fisher para evaluar significancia estadística de las variables categóricas determinado como significativo una $p < 0.05$. Se realizará un análisis multivariado con regresión logística para encontrar variables independientes asociadas a supervivencia global y supervivencia libre de progresión. La SG y SLP serán analizadas por el método de Kaplan Meyer, el análisis de subgrupos será a través de la prueba de log rank o Breslow. Se utilizara análisis de cox para el análisis multivariado. Utilizaremos el sistema operativo SPSS v.23 para el análisis.

V.4 SELECCION DE POBLACION

Se calculó una muestra total de 110 pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, que recibieron tratamiento sistémico con quimioterapia, para CPCNP con enfermedad metastásica o recurrente.

CRITERIOS INCLUSION

1. Pacientes con diagnóstico de CPCNP, metastásico o recurrente, confirmado por histología.
2. Mayores de 18 años de edad, hombres y mujeres.
3. Estado funcional 0 a 2, por escala ECOG.
4. Recibir tratamiento con quimioterapia y metformina.
5. Muestra de tejido disponible para determinación de LKB1 por IHQ.

CRITERIOS EXCLUSION

1. Información incompleta en expediente electrónico o físico.
2. Tratamiento de quimioterapia no especificado.
3. Muestra insuficiente de tejido, para determinación de LKB1 por IHQ.

VI. CONSIDERACIONES ETICAS

Se solicitará autorización por Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología, para revisión retrospectiva de expedientes tanto de forma electrónica como físicamente.

VII. RESULTADOS

Se reportó la determinación de LKB1 de 248 muestras con resultados disponibles al momento, de una cohorte estimada de 110 pacientes, mediante una búsqueda de pacientes durante el año 2017, con CPCNP y que recibieron la combinación de quimioterapia y metformina. Las características demográficas principales se muestran en la tabla 1.

TABLA 1. Características demográficas.

La media de edad de la cohorte fue de 62 años, el 66% fueron mujeres. El estado funcional por ECOG 1 se encontró en 85%, sólo el 14% tenía antecedente de diabetes mellitus. El estado de tabaquismo activo se identificó en 33%, tabaquismo pasivo en 22%, y el resto (40%) no fumadores.

En cuanto a histología, el 96% correspondió a adenocarcinoma, de los cuales, el subtipo acinar se encontró en mayor proporción (29%), seguido del sólido (18%) y el papilar (14%). El 100% de los pacientes presentaban mutación de EGFR.

Los principales sitios de enfermedad metastásica, fueron SNC (40%) y pulmón (40%), ningún paciente de esta cohorte preliminar presentó actividad metastásica en hígado.

En cuanto la expresión de LKB1, el 66% presentó algún porcentaje de expresión (5 a 80%), mientras que el 33% la expresión de LKB1 fue negativa. La intensidad 1 fue la más frecuente (48%, 13 pacientes), aunque cualquier grado fue considerado como positivo.

Quimioterapia + Metformina			Media	Recuento
Edad			62	
Genero	Female			18
	Male			9
ECOG	0			2
	1			23
	2			2
DM	No			23
	Yes			4
Tabaquismo	No			18
	Si			9
Grupo_tabaco	No fumador			11
	Fumador Pasivo			6
	Ex fumador			0
	Fumador Activo			10
Histology_aden	Otro			1
	Adenocarcinoma			26
Subtipo_histología_aden	Lepidico			3
o	Acinar			8
	Papilar			4
	Solido			5
	micropapilar			1
	NE/Mixto/Otro			6
status_EGFR	WT/Muestra insuficiente			0
	EGFR			23
AT_SNC	No			16
	Si			11
AT_Pulmon	No			16
	Si			11
AT_Higado	No			26
	Si			0
Porcentaje_LKB1	.00			9
	5.00			4
	10.00			2
	20.00			4
	60.00			3
	70.00			2
	80.00			3
Intensidad_LKB1	.00			9
	1.00			13
	2.00			2
	3.00			3

En el análisis preliminar, las curvas de Kaplan-Meier muestran una tendencia a mayor SLP en pacientes con LKB1 positivo, media de 13.1 meses comparado con 10.3 meses en LKB1 negativo (HR 0.433, 0.16-1.16, p=0.096). En cuanto a SG, la media no fue alcanzada en el grupo de LKB1 positivo, mientras que en que grupo de LKB1 negativo fue de 31.6 meses (HR 1.22, 0.28-9.26, p=0.583). (Figura 1) Las características completas, incluyendo la adición o no de metformina, se muestran en la tabla 2, en la cual no se demuestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos estudiados.

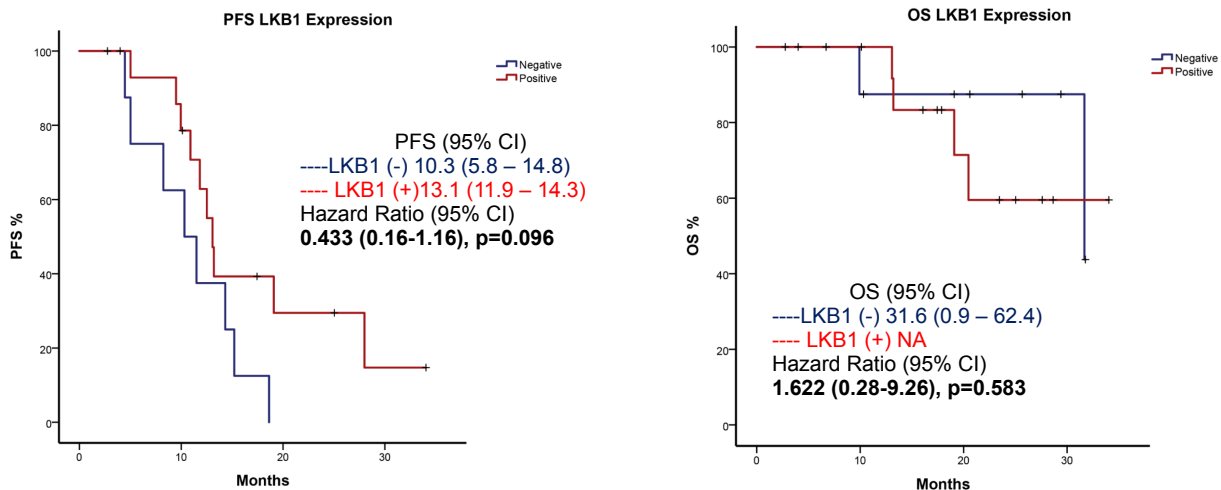


Figura 1. Curvas de Kaplan-Mayer de SLP (izquierda, PFS) y SG (derecha, OS) en relación a la expresión de LKB1. La línea roja representa LKB1 positivo, la línea azul representa LKB1 negativo. CI, intervalo de confianza; NA, no alcanzado.

Tabla 2. Análisis interino de SG y SLP.

Características	n	Media, meses	IC 95%		P	HR (95% IC)
			Límite inferior	Límite superior		
SLP	24	12.5	10.2	14.8		
LKB1 positivo	16	13.1	11.9	14.3		
Sin metformina	6	12.5	4.5	20.5	0.542	0.096
Con metformina	10	13.1	0.0	28.4		
LKB1 negativo	8	10.3	5.8	14.8		
Sin metformina	3	11.5	1.1	21.9	0.665	
Con metformina	5	10.3	5.9	14.8		
SG	24	31.7	24.2	32.1		
LKB1 positivo	16	NA	NA	NA		
Sin metformina	6	19.1	12.7	21.6	0.061	0.583
Con metformina	10	NA	NA	NA		
LKB1 negativo	8	31.6	0.9	62.4		
Sin metformina	3	NA	NA	NA	0.209	
Con metformina	5	31.6	16.5	38.1		

En el ensayo en líneas celulares A549 con baja expresión de LKB1, se encontró que la viabilidad celular disminuía de forma proporcional a mayor concentración de cisplatino con o sin metformina, siendo mayor la disminución en las líneas celulares con la combinación de cisplatino y metformina, y con una diferencia significativa con las concentraciones CIS 2 y 3, la cual fue reproducible en 3 ensayos realizados (Figura 2).

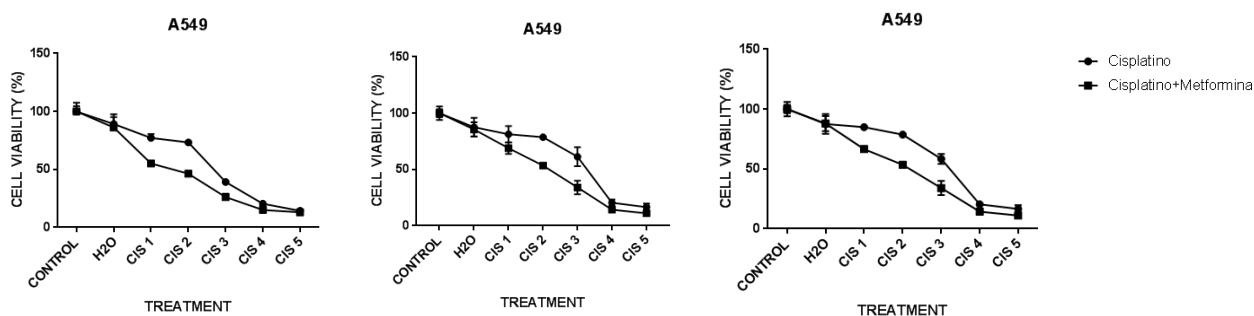


Figura 2. Viabilidad celular en relación a diferentes concentraciones de cisplatino (CIS1 a 5, ver anexo 2) con o sin metformina.

VIII. DISCUSION

En los resultados preliminares, se encontró una tendencia hacia mayor SLP y SG en pacientes con expresión de LKB1 positivo en comparación con la expresión negativa de LKB1, aunque no fue estadísticamente significativa. Estos resultados son consistentes con estudios previos, donde la pérdida de LKB1 se ha asociado con fenotipos más agresivos y peor pronóstico en CPCNP.

El presente estudio, es el primero en determinar la asociación pronostica y predictiva de la expresión de LKB1 en pacientes con CPCNP, que recibieron tratamiento con quimioterapia y metformina, en población mexicana. Considerando que la quimioterapia continúa siendo el piedra angular del tratamiento sistémico en cáncer de pulmón, la relevancia de la expresión de LKB1 y su relación con el tratamiento con metformina, parece atractiva, ya que este último es un fármaco de fácil acceso y bajo costo, con perfil de seguridad manejable; y la determinación de LKB1 por IHQ, la cual es un método universalmente empleado y reproducible, con el que se cuenta en la mayoría de centros hospitalarios del país.

Se espera que al incrementar el número de pacientes analizados, se mantenga esta tendencia, e incluso representar una diferencia significativa. Asimismo, la identificación de variables clínico-patológicas asociadas a la SG y la expresión de LKB1 en esta cohorte de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología.

El análisis en líneas celulares, sugiere que la baja expresión de LKB1 por IHQ, a determinadas concentraciones de cisplatino, podría ser un factor predictivo para considerar tratamiento con cisplatino como monoterapia o en combinación con metformina. Estos resultados requieren de confirmación en ensayos clínicos.

Dentro de las limitaciones del estudio, consideramos la naturaleza retrospectiva del mismo, por lo que estos resultados deberán confirmarse en un ensayo clínico prospectivo, o con una mayor cohorte de pacientes.

Finalmente, con estos resultados preliminares, podemos concluir que en pacientes con CPCNP, la determinación de LKB1 por IHQ puede ser un biomarcador pronóstico útil, y aquellos con expresión positiva de LKB1, presentan una tendencia hacia una mejor SLP y SG.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Globocan 2012. World Health Organization Web site. <http://globocan.iarc.fr/>. Acceso: 13 de noviembre de 2017.
2. Arrieta-Rodríguez OG, Guzman-De Alba E, Alba-Lopez LF, et al. National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer. *Rev Invest Clin* 2013;65 Suppl 1:S5-84.
3. Arrieta-Rodríguez, O. (2016). *Cáncer de pulmón de células no pequeñas*. Ciudad de México, México. Ed PyDESA.
4. Calles A, Sholl LM, Rodig SJ, et al. Immunohistochemical Loss of LKB1 Is a Biomarker for More Aggressive Biology in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21(12):2851-60.
5. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998;18(1):38-43.
6. Bonanno L, De Paoli A, Zulato E, et al. LKB1 expression correlates with increased survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy and bevacizumab. *Clin Cancer Res*. 2017;23(13):3316-3324.
7. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7(6):654-65.
8. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(2):246-50.
9. Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle*. 2009;8(6):909-15.
10. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2009;8(13):2031-40.
11. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res*. 2011;71(9):3196-201.
12. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osorio-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):3993-4005.
13. Schakelford DB, Abt E, Gerken L, et al. LKB1 Inactivation Dictates Therapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer to the Metabolism Drug Phenformin. *Cancer Cell* 2013;23(2):143-58.
14. Bernicker EH, Miller RA, Cagle PT. Biomarkers for Selection of Therapy for Adenocarcinoma of the Lung. *J Oncol Pract* 2017;13(4):221-227.

X. ANEXOS

Anexo 1. Proceso para realizar pruebas de inmunohistoquímica de forma manual.

CORTES

1. Realizar los cortes con su control correspondiente a 3 micras.

DESPARAFINADO

1. Colocar las laminillas en el horno a 60°C toda la noche.
2. Colocarlas en el baño con xilil durante 5 minutos.
3. Darles baños con etanol descendente 96°, 80, 70 y 60%.
4. Enjuagar con agua corriente.

RECUPERACION ANTIGÉNICA

1. Precalentar la olla durante 5 minutos en el horno de microondas.
2. Preparar el recuperador marca BSB, 70 mL 1:20 con agua destilada (esta solución recuperadora puede usarse dos veces), y llenar un vaso de coplin.
3. Colocar las laminillas una vez despapafinadas en el vaso de coplin, cerrarlo y colocarlo dentro de la olla previamente calentada.
4. Colocar la olla en el horno y volver a calentar durante 5 minutos, o hasta que se escuche un ruido permanente de la válvula de la olla durante un minuto.
5. Sacar la olla y dejarla enfriar hasta que la válvula de presión baje, abrir la olla con cuidado, dejar reposar 5 minutos, sacar el vaso, sin abrirlo dejar reposar 5 minutos.
6. Abrir el vaso de coplin con cuidado y dejarlo enfriar hasta que la solución se torne cristalina.
7. Pasar las laminillas en un recipiente con agua corriente.
8. Pasar las laminillas en un recipiente con agua destilada.

INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Colocar las laminillas en los cover plates usando una gota de buffer PBS evitando la formación de burbujas.
2. Colocar los cover plates en la gradilla correspondiente.
3. Lavar con buffer, llenando la parte superior de los cover plates.
4. Dejar que baje totalmente el buffer de lava, esto sucede a los 5 minutos (si baja rápidamente volver a montar la laminilla en el cover plate porque es mal colocada).
5. Adicionar 3 gotas del inhibidor (H₂O₂), incubar a 37°C durante 5 minutos.
6. Lavar con PBS durante 5 minutos.
7. Adicionar el anticuerpo primario a la dilución a probar o a la estandarizada, incubar 45 minutos a 37°C.
8. Lavar con PBS durante 5 minutos.
9. Adicionar el reactivo mach 4 HRP polymer marca biocare e incubarlo durante 15 minutos a 37°C.
10. Lavar con PBS durante 5 minutos.
11. Uso obligatorio de guantes a partir del paso 12.

12. Revelar con DAB (prepararla usando 1 gota de H₂O₂ y una gota de DAB), calcular la cantidad a usar para prepararla antes de revelar, colocar la mezcla en cada laminilla de 3 a 10 minutos.
13. Observar las laminillas al microscopio.
14. Decantar el exceso de DAB en un apósito o papel.
15. Parar la reacción colocando las laminillas en un recipiente con agua corriente.
16. Enjuagarlas en otro recipiente con agua corriente.
17. Contrateñir con hematoxilina 20 segundos, enjuagar con agua corriente.
18. Azular con hidróxido de amonio.
19. Deshidratar en alcoholes ascendentes 60, 70, 80 y 96 y acetona, dejar secar en horno a 60°C y montar con entellan.

Anexo 2. Concentraciones de cisplatino y metformina, en estudio de líneas celulares.

Cisplatino:

- 50 µl stock + 450 µl = 100 µM = 10 µM
- 75 µl stock + 425 µl = 150 µM = 15 µM
- 100 µl stock + 400 µl = 200 µM = 20 µM
- 125 µl stock + 375 µl = 250 µM = 25 µM
- 150 µl stock + 450 µl = 100 µM = 10 µM stock + 350 µl = 300 µM = 30 µM

Metformina, concentraciones finales:

- A549: 10 mM, 20 µl por pozo.
- HCC827: 5mM 10 µl por pozo.

Anexo 3. Definición y operacionalización de variables.

VARIABLES DEPENDIENTES

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Escala	Unidad de medición
Supervivencia Global	Tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de tratamiento de la paciente y muerte	Tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de tratamiento de la paciente y la fecha registrada de muerte o fecha de última visita en caso de pacientes pérdidas o vivas al momento del análisis	Dimensional continua	Meses
Supervivencia Libre de Progresión	Tiempo transcurrido entre el inicio de tratamiento de la paciente y el diagnóstico de progresión de la enfermedad	Tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento de la paciente y la fecha registrada de la progresión de la enfermedad	Dimensional continua	Meses

Respuesta	<p>Cambios en los diámetros mayores de las lesiones blanco considerando:</p> <p>Respuesta Completa: Desaparición de todas las lesiones diana</p> <p>Respuesta Parcial: Reducción de al menos 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, tomando como referencia la suma</p> <p>Progresión de la Enfermedad: Incremento de al menos el 20% en la suma de los diámetros mayores de base</p> <p>Enfermedad Estable: Reducción no suficiente para calificar como RP o incremento insuficiente para calificar como EP, tomando como referencia la suma más pequeña de los diámetros mayores desde el inicio del tratamiento.</p>	Se evaluara la respuesta con TAC y/o RM a través del reporte por escrito del radio-oncólogo – investigador asociado.	Nominal Policotomica	1 RC 2 RP 3 PE 4 EE
-----------	---	--	-------------------------	------------------------------

VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Escala	Unidad de medición
Estadio Clínico	Clasificación Clínica para definir la extensión anatómica del tumor	Se obtendrá el expediente clínico, al diagnóstico de CPCNP de acuerdo a la clasificación de TNM/AJCC.	Nominal Policotomica	I II III IV
Tipo Histológico	Clasificación de la estructura microscópica que presentan las células.	Se obtendrá del expediente clínico de la nota de anatomía patológica el tipo histológico de la biopsia para el diagnóstico de CPCNP.	Nominal Policotomica	Adenocarcinoma Otros
Subtipo histológico adenocarcinoma	Clasificación de adenocarcinomas en CPCNP.	Se obtendrá del expediente, el subtipo histológico de adenocarcinoma.	Nominal Policotomica	Lepídico Acinar Papilar Sólido Micropapilar NE/Mixto/Otros

Edad	Años cumplidos desde el nacimiento hasta el día del inicio del tratamiento	Se registrará la edad en años referida en el expediente clínico al momento del inicio de tratamiento	Dimensional continua	Números enteros en años
Diabetes Mellitus	La Diabetes Mellitus es un conjunto heterogéneo de síndromes de etiopatogenia multifactorial. El nexo común es el trastorno metabólico, fundamentalmente la hiperglucemia crónica, aunque también las alteraciones en el metabolismo lipídico y proteico.	Se tomará del expediente clínico de la Química Sanguínea el Nivel de Glucosa	Ordinal	Sí No
ECOG	La escala de ECOG valora el estado funcional referente al estado de salud general y las actividades diarias que un paciente puede llevar a cabo	Se tomará de la nota de Oncología Médica al inicio del tratamiento.	Ordinal	0 1 2 3 4 5
Quimioterapia	La quimioterapia es una técnica terapéutica que consiste en la administración de sustancias químicas para el tratamiento del cáncer.	Se recabará del expediente, el tipo de QT, el número de líneas de tratamiento y el escenario donde fue empleado.	Dimensional Continua	Tipo de quimioterapia Líneas de tratamiento
Tabaquismo	El tabaquismo es la adicción al tabaco, provocada principalmente por uno de sus componentes más activos, la nicotina.	Se tomará del expediente clínico el antecedente de tabaquismo	Ordinal	Sí No
Grupo tabaquismo	El grupo de tabaquismo se determina en relación al antecedente y/o exposición al tabaco.	Se tomará del expediente clínico el tipo de tabaquismo	Nominal Policotómica	No fumador Pasivo Ex fumador Activo
AT SNC	Actividad tumoral en sistema nervioso central.	Se tomará del expediente clínico y estudios de imagen.	Ordinal	Sí No

AT Pulmón	Actividad tumoral en pulmón ipsi o contralateral.	Se tomará del expediente clínico y estudios de imagen.	Ordinal	Sí No
AT Hígado	Actividad tumoral en hígado.	Se tomará del expediente clínico y estudios de imagen.	Ordinal	Sí No
Porcentaje LKB1	Determinación porcentual de expresión de LKB1 por IHQ.	Se tomará del expediente clínico y estudio de patología.	Ordinal	0 5 10 20 60 70 80
Intensidad LKB1	Determinación de intensidad de expresión de LKB1 por IHQ.	Se tomará del expediente clínico y estudio de patología.	Nominal Policotomica	0 1 2 3