

Resultats

5. Resultats

5.1 Variables clinicopatològiques

Les mostres utilitzades en aquest estudi s'han obtingut de malalts de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, en el període comprès entre els anys 1993 i 1997.

Seguint els criteris descrits en el capítol "Material i mètodes", s'han recollit 99 carcinomes de pulmó de cèl·lula no petita. D'aquests casos, s'han analitzat un total de 392 mostres amb les tècniques de citometria de flux. Dels 99 carcinomes, s'han seleccionat 325 mostres de tumor primari i 67 mostres de ganglis (hiliars i mediastínics) amb metàstasis, 34 mostres corresponen a ganglis hiliars i 33 de mediastínics. La mitjana de les mostres estudiades en relació amb el tumor primari és de $3,38 \pm 1,33$ i pel que fa als ganglis és d' $1,53 \pm 1,10$.

El tipus anatomopatològic més freqüent d'aquest estudi, ha estat el carcinoma escatós, amb 53 casos (53,5%), seguit de l'adenocarcinoma amb 37 (37,4%), i del carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran (CICG), amb 9 (9,1%). Dels 37 adenocarcinomes, 5 (13,51%) corresponen al subtipus histològic de carcinoma bronquioloalveolar.

Quant al grau de diferenciació, 34 casos (34,3%) han estat ben diferenciats, 39 (39,4%) moderadament diferenciats i 26 (26,2%) pobrament diferenciats. La taula 5-1 relaciona el tipus anatomopatològic i el grau de diferenciació. Les figures 5-1 i 5-2 il·lustren dos casos representatius de carcinoma de cèl·lula no petita: un de ben diferenciat i un altre de pobrament diferenciat.

Taula 5-1. Tipus histològic i grau de diferenciació cel·lular

	Ben diferenciat	Moderadament diferenciat	Pobrament diferenciat	Total
Carcinoma escatós	18 (24,5%)	22 (41,5%)	13 (24,5%)	53 (53,5%)
Adenocarcinoma	15 (40,5%)	13 (35,1%)	9 (24,3%)	37 (37,4%)
Carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran	1 (1,11%)	4 (44,44%)	4 (4,44%)	9 (9,1%)
Total	34 (34,3%)	39 (39,4%)	26 (26,3%)	99 (100%)

La majoria dels malalts d'aquest estudi són homes en 89 casos (89,9%) i tan sols hi ha 10 dones (10,1%). Si s'examina el tipus anatomopatològic en funció del sexe, a les dones predomina l'adenocarcinoma, ja sigui del tipus habitual o del subtipus bronquioloalveolar. Així, la totalitat de tumors diagnosticats en el sexe femení d'aquesta tesi (10 casos) corresponen a adenocarcinomes, amb 3 casos de bronquioloalveolars.

La distribució del tipus histològic en els homes és més heterogènia, i hi predomina el carcinoma escatós, seguit de l'adenocarcinoma. A la taula 5-2 es relacionen les freqüències relatives als tipus histològics en els homes en funció de tres categories d'edats.

Taula 5-2. Relació dels diferents tipus histològics en funció de l'edat, entre els malalts del sexe masculí

	≥ 35 i < 55 anys	≥ 55 i < 75 anys	≥ 75 anys	Total
Adenocarcinoma	13 (50%)	13 (22,8%)	1 (16,6%)	27 (30,3%)
Carcinoma escatós	9 (34,6%)	40 (70,1%)	4 (66,6%)	53 (59,5%)
Carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran	4 (15,3%)	4 (7%)	1 (16,6%)	9 (10,1%)
Total	26 (29,3%)	57 (64%)	6 (6,7%)	89 (100%)

De tots els malalts estudiats es disposa de seguiment clínic. Atès que els casos estudiats formen part d'una sèrie de malalts tractats amb cirurgia, tots ells pertanyen als estadis I, II o IIIA. Així, dels 99 CPCNP, 34 casos (34,3%) pertanyen a l'estadi I, 16 casos (16,1%) a l'estadi II i 49 casos (49,4%) a l'estadi IIIA. A la taula 5-3 es relacionen els diferents tipus histològics amb la distribució per estadis.

Taula 5-3. Tipus histològic i estadi clínic

	Estadi I	Estadi II	Estadi IIIA	Total
Carcinoma escatós	22 (41,5%)	10 (18,9%)	21 (39,6%)	53 (53,5%)
Adenocarcinoma	9 (24,3%)	2 (5,4%)	26 (70,3%)	37 (37,3%)
Carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran	3 (33,3%)	4 (44,44%)	2 (22,2%)	9 (9,1%)
Total	34 (34,3%)	16 (16,1%)	49 (49,4%)	99 (100%)

El nombre de mitosis per 10 camps a gran augment (CGA) oscil·lava entre 0 i 116. En 29 casos (29,3%) el nombre de figures mitòtiques era inferior a 15/10 (CGA), en 37 casos (37,4%) el nombre de mitosis estava entre 15 i 32 /10 (CGA) i en els 33 casos restants (33,3%) se'n comptaven més de 32/10 (CGA). A la taula 5-4 es mostra aquesta distribució.

Taula 5-4. Relació del contingut de figures mitòtiques

MITOSIS	≤ 15	$> 15 \leq 32$	> 32
Nre. de casos	29	37	33
(%)	(29,3%)	(37,4%)	(33,3%)

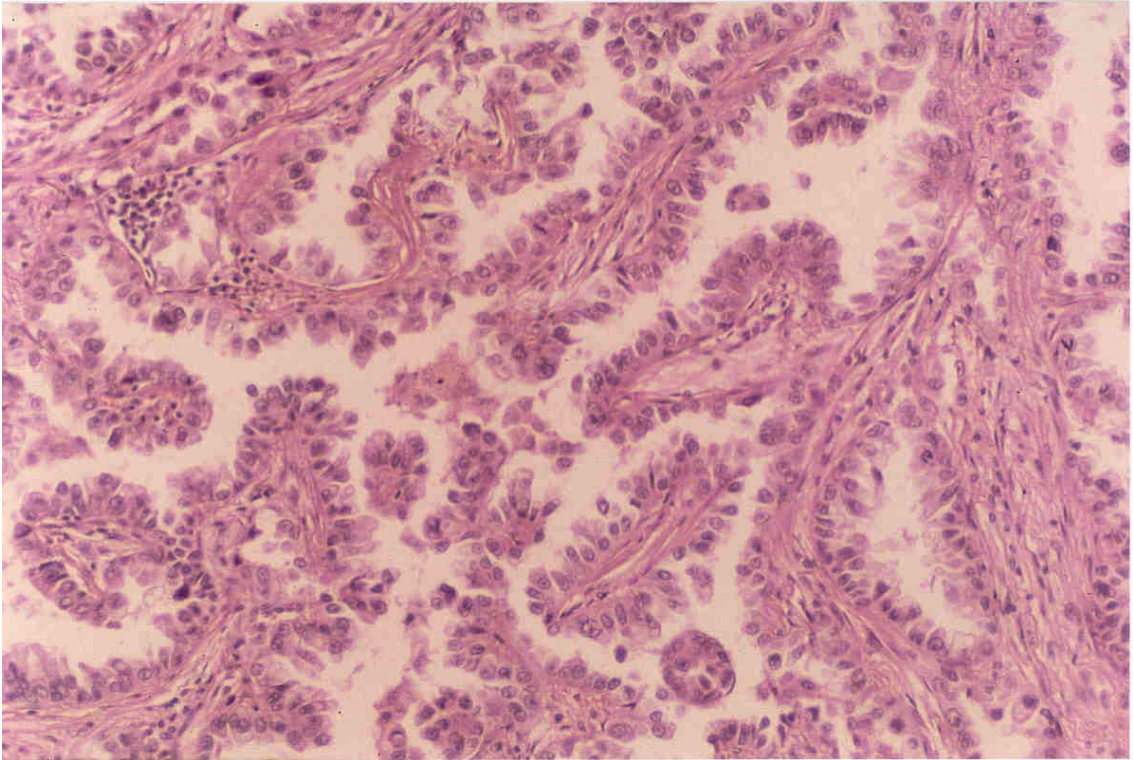


Figura 5-1. Tumor ben diferenciat. Adenocarcinoma bronquioloalveolar

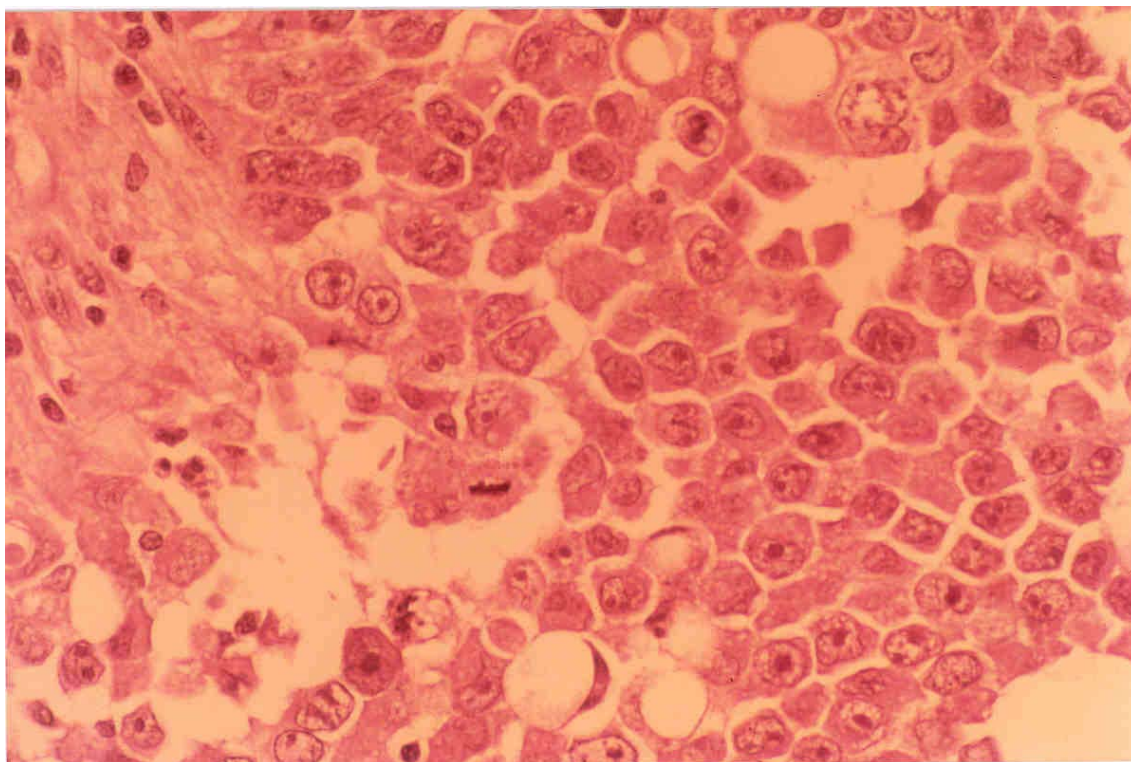


Figura 5-2. Tumor pobrament diferenciat. Carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran

5.2 Variables per immunohistoquímica

En tots els casos s'han realitzat estudis amb immunohistoquímica i s'ha valorat l'expressió dels antígens relacionats amb el cicle cel·lular: Ki-67, PCNA, les ciclins D1 i E, i p53.

5.2.1 Antígens de proliferació cel·lular quantificats per immunohistoquímica

La localització subcel·lular de l'expressió de PCNA i de Ki-67 s'ha trobat en el nucli de les cèl·lules amb proliferació. Tots els casos estudiats han mostrat algun grau de positivitat. A diferència de la p53, els teixits normals proliferatius propers als CPCNP expressaven ambdós antígens de proliferació. La distribució de la immunoexpressió de Ki-67 en els carcinomes escatósos s'ha localitzat a la perifèria dels nusos neoplàstics, i en els adenocarcinomes la distribució ha estat aleatòria. De manera característica els nuclis amb figures de mitosi han estat positius per al Ki-67 però no per al PCNA. Globalment, en 35 casos (35,3%) l'índex de Ki-67 era baix (menys del 33% cèl·lules positives) i en 64 (64,7%) l'índex era alt (per sobre del 33% de cèl·lules positives), amb un mínim de 2 (de 200 de comptades) cèl·lules positives i un màxim de 158 (de 200 de comptades).

La distribució de la immunotinció del PCNA ha estat semblant a la comentada per al Ki-67. En general, en 30 casos (30,3%) l'índex de PCNA era baix (per sota del 41% cèl·lules positives) i en els 69 casos restants (69,7%) l'índex de PCNA era alt (per sobre del 41% de cèl·lules positives), amb un mínim de 17 cèl·lules positives i un màxim de 166 de les 200 de comptades. A les taules 5-5 i 5-6, es relaciona el grau de positivitat amb l'expressió dels anticossos antiKi-67 i antiPCNA-PC10 i la distribució d'aquesta expressió. Les figures 5-3 i 5-4 il·lustren dos casos representatius d'expressió positiva de PCNA i de Ki-67.

Taula 5-5. Expressió dels antígens de proliferació cel·lular

Grau de positivitat	Ki-67	PCNA
Alt (%)	64 (64,7%)	69 (69,7%)
Baix (%)	35 (35,3%)	30 (30,3%)

Taula 5-6. Distribució dels índexs de proliferació del Ki-67 i del PCNA

Índex Ki-67	≤ 33	$> 33 \text{ i } \leq 46$	> 46
Nre. de casos	35	33	31
(%)	(35,48%)	(33,3%)	(31,3%)
Índex PCNA	≤ 41	$> 41 \text{ i } \leq 54$	> 54
Nre. de casos	30	32	37
(%)	(30,3%)	(32,3%)	(37,4%)

5.2.2 Expressió per immunohistoquímica de la ciclina D1 i de la ciclina E

Les ciclines que s'han quantificat són la D1 i la E, seguint la mateixa sistemàtica que per a la p53, és a dir: intensitat (d'1 a 6) i extensió (d'1 a 6). L'expressió immunohistoquímica era exclusivament nuclear, i s'han considerat negatives totes les altres possibles tincions, citoplasmàtica o amb fons. Dels 99 casos, 25 (25,2%) foren negatius per a la ciclina D1 i 74 (74,8%) foren positius. D'aquests últims, 50 casos (50,5%) van ser d'intensitat i extensió escassa i 24 (24,3%), de moderat a fortament positius.

De la mateixa manera, dels 99 CPCNP, 42 (42,4%) foren negatius per a la ciclina E i 57 (57,6%) foren positius. Dins d'aquests, 40 casos (40,4%) foren molt dèbils en

intensitat i molt aïllats i 17 casos (17,2%) entre moderat i molt positius. La taula 5-7 mostra la distribució de l'expressió de les ciclins D1 i E. A les figures 5-5 i 5-6 s'il·lustren dos casos representatius d'expressió positiva de la ciclina D1 i de la ciclina E.

Taula 5-7. Expressió de la ciclina D1 i de la E

Ciclina D1	Negatius	$> 0 \text{ i } \leq 4$	> 4
Nre. casos	25	50	24
(%)	(25,3%)	(50,5%)	(24,2%)
Ciclina E	Negatius	$> 0 \text{ i } \leq 4$	> 4
Nre. casos	42	40	17
(%)	(42,4%)	(40,4%)	(17,2%)

5.2.3 Quantificació de la p53 per immunohistoquímica

De manera semblant al que s'ha comentat per als antígens de proliferació cel·lular, la positivitat immunohistoquímica per a la p53 s'ha localitzat en els nuclis de les cèl·lules neoplàstiques de manera que el seu citoplasma i els teixits no neoplàstics no expressen p53. La immunotinció en els carcinomes escatosos s'ha distribuït preferentment a la perifèria dels nius neoplàstics, mentre que en els adenocarcinomes la distribució ha estat aleatòria sense cap predominant, com també passava amb els antígens de proliferació. Del total de mostres quantificades s'obtingueren 27 casos (27,3%) negatius, i 72 casos (72,7%) positius. Dels positius,

47 casos (47,5%) mostraren elevada immunotinció tant en intensitat com en extensió. En canvi, 25 casos (25,2%) es consideraren com de baixa expressió immunohistoquímica. A la taula 5-8 es recullen aquests resultats. La Figura 5-7 il·lustra un cas representatiu d'expressió positiva per a la p53.

Taula 5-8. Grups de positivitat per a la P53

P53	Negatius	$> 0 \text{ i } \leq 6$	$> 6 \text{ i } \leq 12$
Nre. de casos	27	25	47
(%)	(27,3%)	(25,2%)	(47,5%)

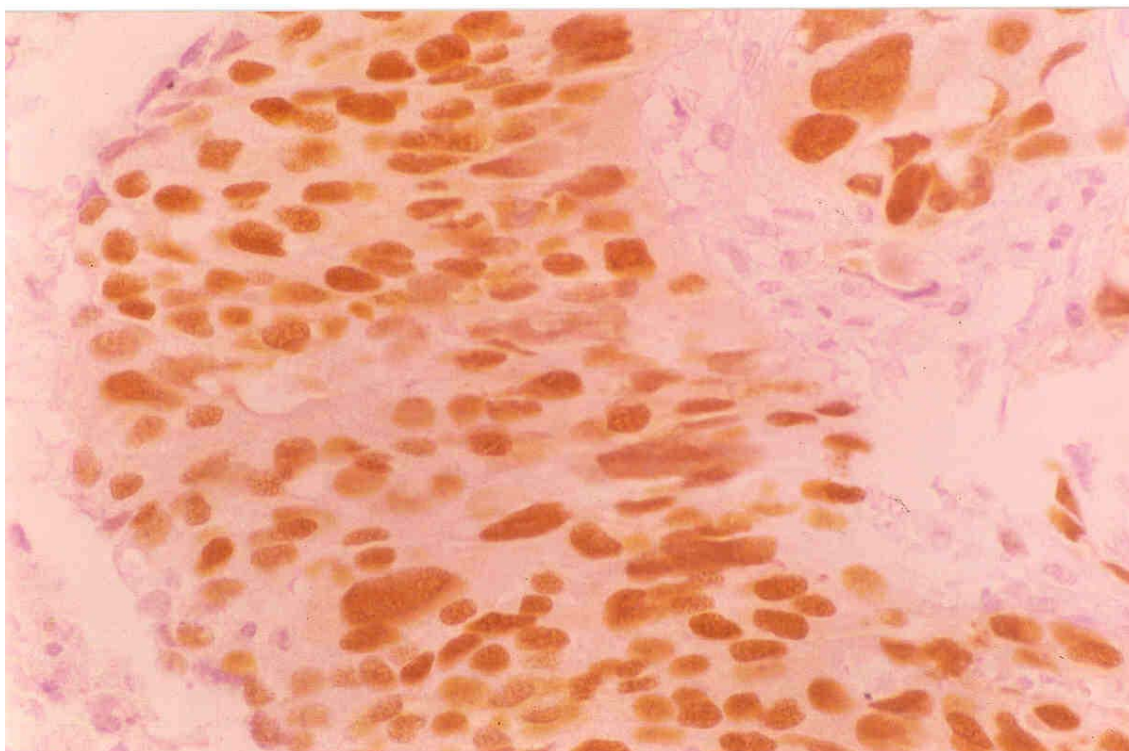


Figura 5-3. Tumor amb un índex elevat de PCNA-PC10

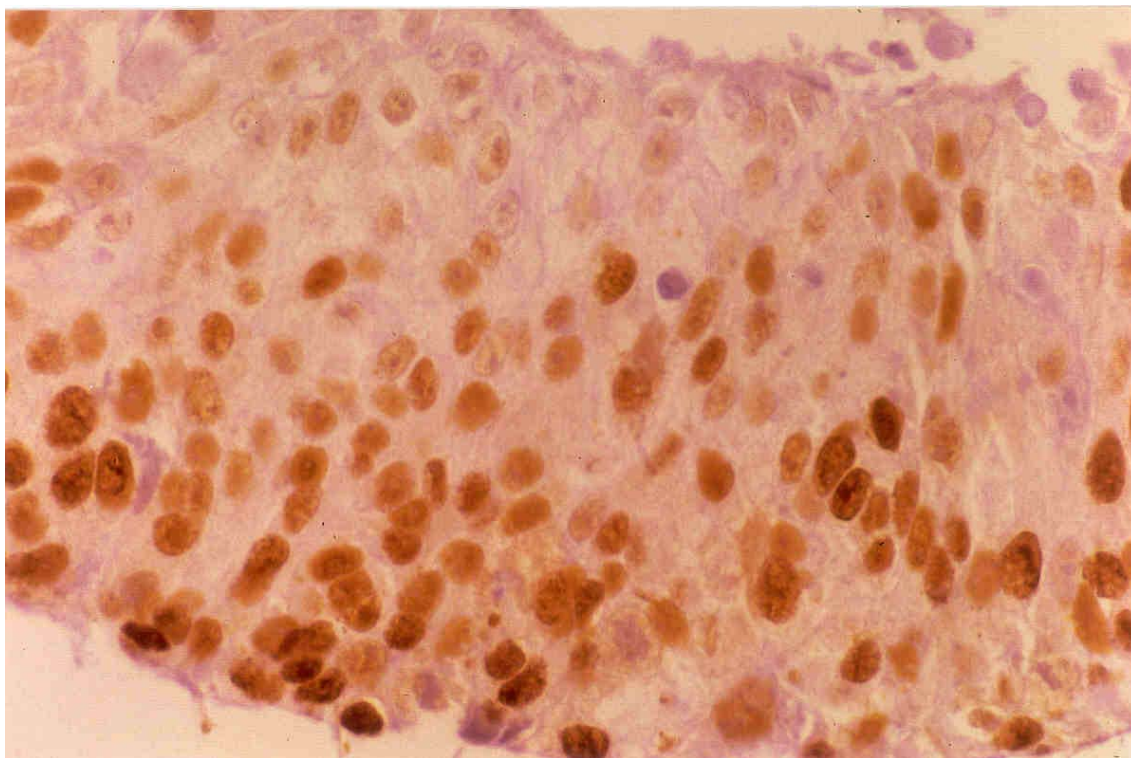


Figura 5-4. Tumor amb un índex elevat de ki-67

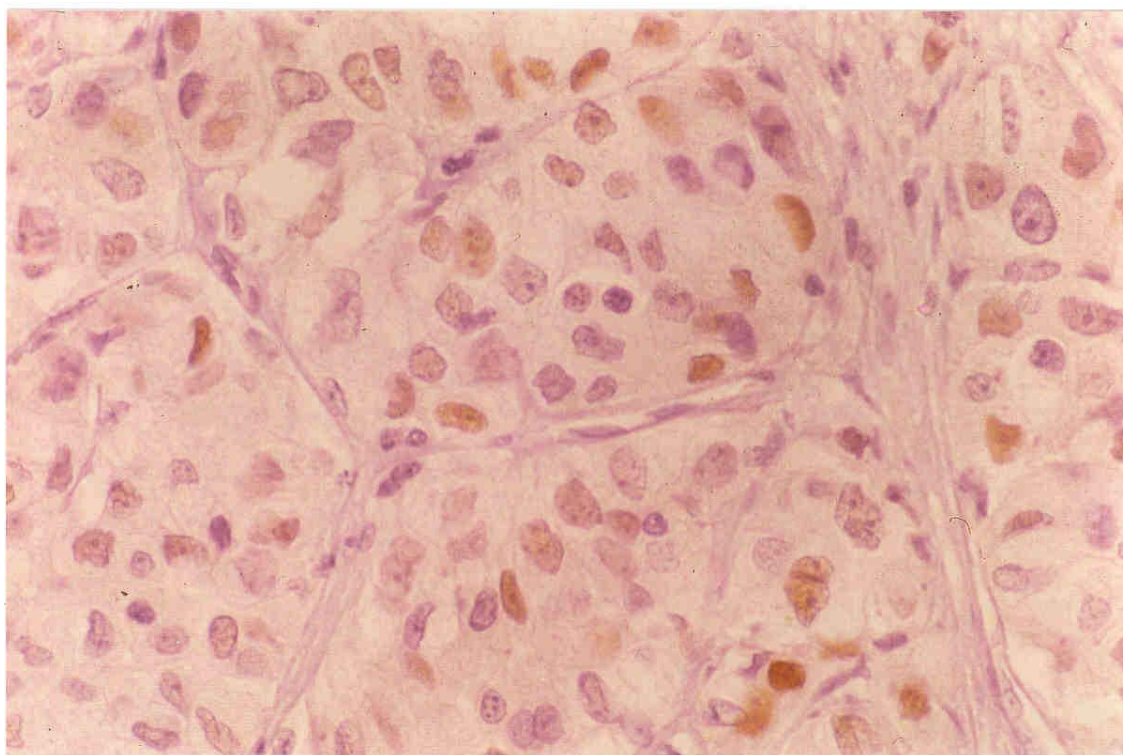


Figura 5-5. CPCNP positiu per a la ciclina D1

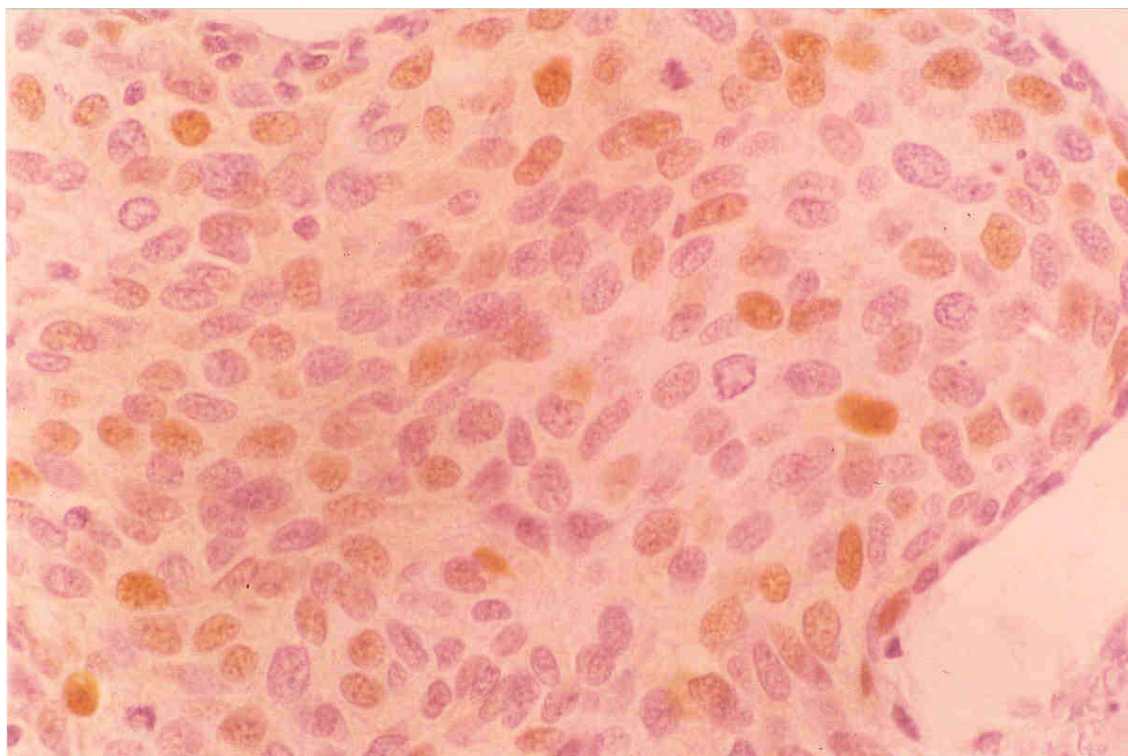


Figura 5-6. CPCNP positiu per a la ciclina E

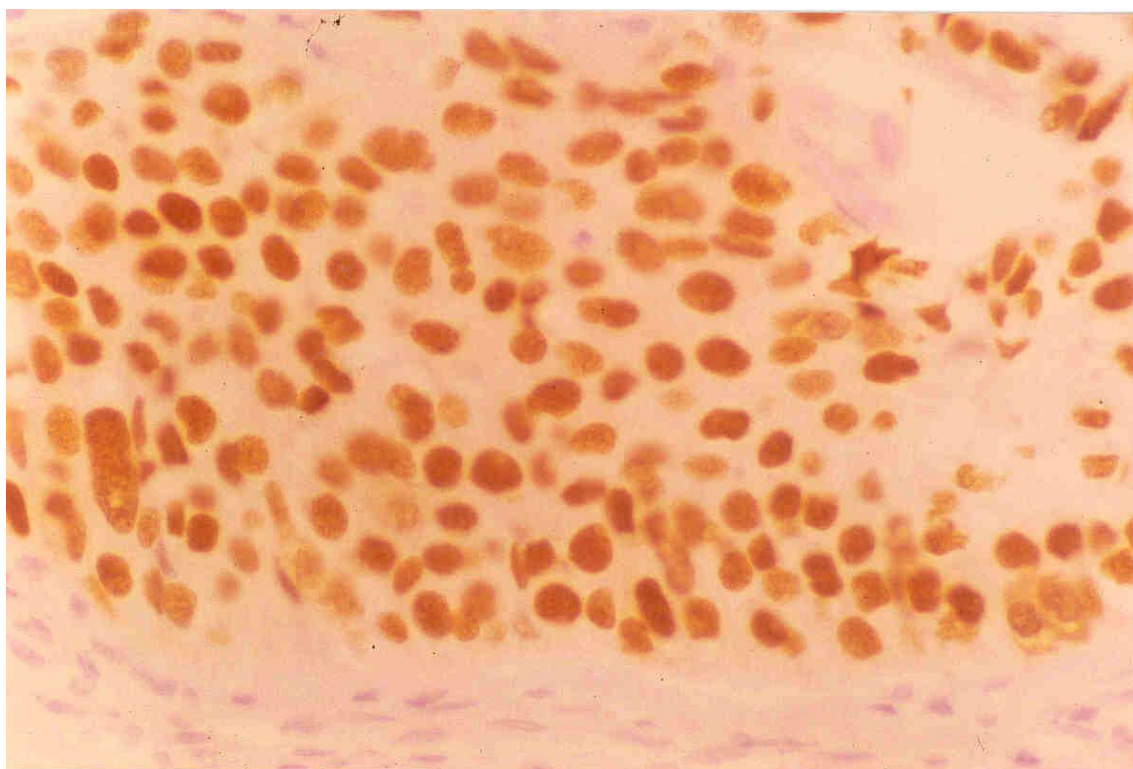


Figura 5-7. Tumor amb una gran expressió de proteïna p53

5.3 Resultats de les variables per citometria de flux

5.3.1 Ploidia per citometria de flux

Per quantificar el contingut de DNA i PCNA de les mostres s'utilitzà un citòmetre de flux *FACScan* (Becton & Dickinson) i la metodologia adient, explicat en el capítol "Material i mètodes".

Per poder valorar el contingut de DNA de les cèl·lules es va fer servir el sistema informàtic *CellFIT* (Becton & Dickinson) per quantificar l'índex de DNA i el percentatge de les cèl·lules a les fases G₁, S, G₂ i M del cicle.

Es van considerar diploides els casos en què totes les mostres del tumor primari tenien un índex de DNA igual a la unitat. Es van considerar com a aneuploides els casos en què com a mínim a una de les mostres l'índex de DNA era més gran d'1. Els casos en què dins de la mateixa mostra s'objectivava més d'una població aneuploide amb diferents índexs de DNA, es van considerar com a multiploides. Dels 99 casos estudiats, tres no tenien mostres de tumor primari. Així, 16 casos foren diploides (16,6%), 80 casos foren aneuploides (83,3%), dels quals 13 van ser multiploides (16,2%).

Pel que fa als ganglis, es va seguir la mateixa sistemàtica que per al tumor primari. Així doncs, dels 26 casos de ganglis hiliars, 7 (26,9%) foren diploides i 19 casos (73,1%) foren aneuploides, dels quals 2 (10,5%) es definiren com a multiploides. Dels 21 casos de ganglis mediastítics, 10 (47,6%) foren diploides i 11 (52,4%) aneuploides. A la taula 5-9 s'han agrupat els casos segons els criteris descrits anteriorment.

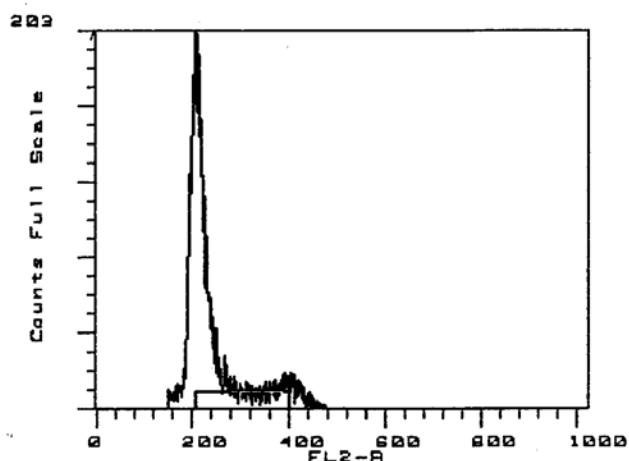
Taula 5-9. Resultats de la ploïdia

PLOÏDIA	TUMOR PRIMARI	GANGLIS	
		hiliars	mediastínic
Diploïdes	16 (16,6%)	7 (26,9%)	10 (47,6%)
Aneuploïdes	80 (83,3%)	19 (73,1%)	11 (52,4%)
Multiploïdes	13 (16,2%)	2 (10,5%)	0 (0%)

A partir de l'índex de DNA de cada mostra es va calcular l'índex de DNA mitjà de cada tumor. A continuació es va procedir a agrupar els tumors en funció de la seva ploïdia. Així, dels 96 casos amb tumor primari investigats en 42 casos (43,75%) estaven inclosos entre l'índex de DNA d'1,5 a 2, seguit del grup amb l'índex de DNA entre 1 i 1,5 en 25 casos (26,04%) i del grup amb l'índex de DNA igual a la unitat en 16 casos (16,66%). Els menys freqüents són els que tenen un índex de DNA superior a 2. A la taula 5-10 s'agrupen els tumors pel seu patró de ploïdia i a les figures 5-8 a 5-13 es mostren uns exemples de cada patró.

Taula 5-10. Distribució dels patrons de ploïdia.

Índex de DNA (íDNA)	Nre. de casos (%)
íDNA = 1	16 (16,66%)
íDNA > 1 i ≤ 1,5	25 (26,04%)
íDNA > 1,5 i ≤ 2	42 (43,75%)
íDNA > 2 i ≤ 2,5	7 (7,30%)
íDNA > 2,5	6 (6,25%)



Patient Name :
 Case Number :
 Tissue Type : PULMON
 Preparation : VINDELOV
 Preparation Date : 12-MAY-95
 Reagents : DNA
 File Name : #11:/2/PULMON215
 Collection Date : 12-MAY-95
 Lab : ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO

Calculation Parameters (Pop.1)

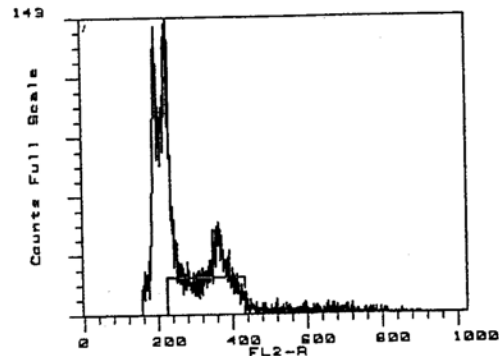
G1 Peak :	208	Model :	RFIT
G2+M Peak:	400	Gate :	1
G1 CV :	5.5	Event Rate :	36
G2+M/G1 Ratio :	1.92	Total Events :	8892

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1 :	6485	74.4
S :	1675	19.2
G2+M :	561	6.4
Total:	8721	100.0

Figura 5-8. Tumor diploide amb un índex de DNA = 1. Es pot veure que la majoria de cèl·lules es troben dins del pic G₀-G₁ que està situat en el canal 200; la resta es reparteix a les fases S i

G₂-M



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	126
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	10392
Preparation Date	:	15-FEB-96			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#11:/2/PULMON458			
Collection Date	:	15-FEB-96			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 224
 G2+M Peak: 431
 G1 CV : 5.8
 G2+M/G1 Ratio : 1.92

Reference Peak Statistics

Region: 160 - 229
 Peak : 194
 CV : 5.9
 Events: 2714

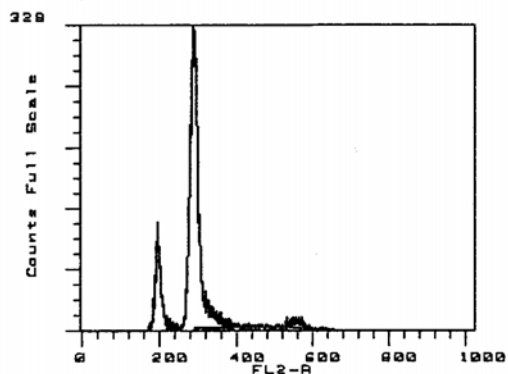
Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.15
 Ratio of CV's : 1.0
 Ratio of Events : 1.1

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	2878	40.0
S	3813	53.0
G2+M	498	6.9
Total	7189	100.0

Figura 5-9. Tumor aneuploide amb un índex de DNA = 1,1 (baix). Es poden observar molt junts els pics G₀-G₁ de la població diploide (el situat més a l'esquerra) i el de l'aneuploide



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	55
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	12009
Preparation Date	:	5-APR-95			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#11:/2/PUL155			
Collection Date	:	5-APR-95			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 290
 G2+M Peak: 567
 G1 CV : 3.4
 G2+M/G1 Ratio : 1.96

Reference Peak Statistics

Region: 181 - 211
 Peak : 196
 CV : 2.6
 Events: 1678

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

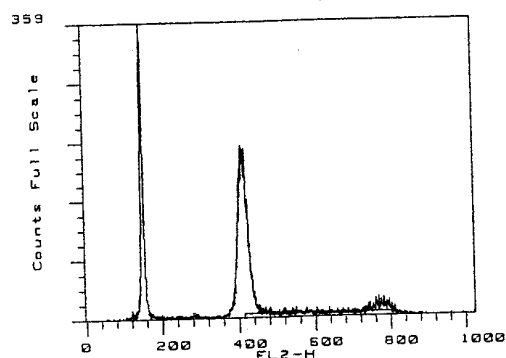
Ratio of Peaks : 1.48
 Ratio of CV's : 1.4
 Ratio of Events : 5.0

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1 :	8441	84.8
S :	1134	11.4
G2+M :	375	3.8
Total:	9950	100.0

Figura 5-10. Tumor aneuploide amb un índex de DNA mitjà ($iDNA = 1,48$). És quasi triploide.

S'hi diferencien clarament el G_0 - G_1 de la població control i el de la població aneuploide



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	CANCER PULMON	Event Rate	:	83
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	12371
Preparation Date	:	18-OCT-94			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULMON065			
Collection Date	:	18-OCT-94			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 415
 G2+M Peak: 803
 G1 CV : 2.9
 G2+M/G1 Ratio : 1.93

Reference Peak Statistics

Region: 141 - 162
 Peak : 151
 CV : 2.3
 Events: 2872

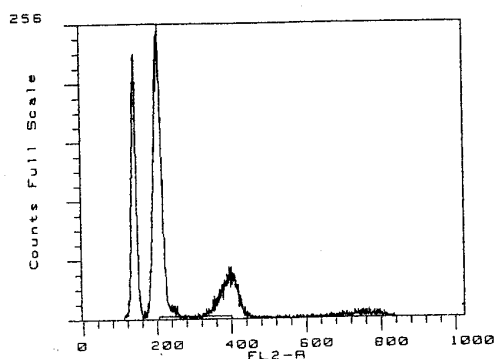
Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 2.75
 Ratio of CV's : 1.2
 Ratio of Events : 2.2

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1 :	6307	71.8
S :	1823	20.7
G2+M :	658	7.5
Total:	8788	100.0

Figura 5-11. Tumor aneuploide amb un índex de DNA alt (íDNA = 2,75). Aquest tumor té quasi 3 vegades més DNA del normal (6n)



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	92
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	12859
Preparation Date	:	18-JUL-95			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULMON364			
Collection Date	:	18-JUL-95			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 206
 G2+M Peak: 400
 G1 CV : 4.9
 G2+M/G1 Ratio : 1.94

Reference Peak Statistics

Region: 125 - 161
 Peak : 143
 CV : 4.2
 Events: 3306

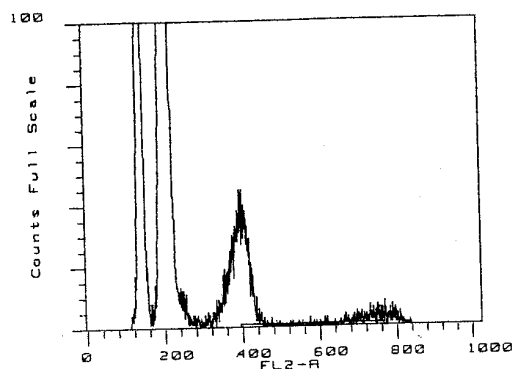
Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.44
 Ratio of CV's : 1.2
 Ratio of Events : 2.0

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	6464	72.8
S	312	3.5
G2+M	2102	23.7
Total:	8878	100.0

Figura 5-12. Tumor multiploide. S'hi pot observar la presència de tres pics característics, el primer de l'esquerra correspon a la població control (diploide) i els altres dos a les poblacions aneuploides, la primera té un índex de DNA mitjà ($iDNA = 1,44$). L'altra població està analitzada a la figura següent (figura 5-13)



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	92
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	12859
Preparation Date	:	18-JUL-95			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULMON364			
Collection Date	:	18-JUL-95			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 395
 G2+M Peak: 765
 G1 CV : 2.3
 G2+M/G1 Ratio : 1.94

Reference Peak Statistics

Region: 125 - 161
 Peak : 143
 CV : 4.2
 Events: 3306

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 2.76
 Ratio of CV's : 0.5
 Ratio of Events : 0.5

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1782	76.2
S	202	8.6
G2+M	354	15.1
Total:	2338	100.0

Figura 5-13. Segona població del tumor multiploide amb un índex de DNA alt (iDNA = 2,76).

El pic control és el mateix per a totes dues poblacions

5.3.2 Fase S per citometria de flux

De la mateixa manera que es van valorar els índexs de DNA mitjans, es va obtenir la mitjana de la fase S de cada una de les mostres que formaven part d'un mateix tumor. Posteriorment, es van agrupar els casos en funció que la mitjana de les mostres fos baixa, mitjana o alta. Dels 96 casos de tumor primari investigats, en 29 (30,2%) el percentatge de cèl·lules en fase S era igual o inferior al 12%, en 37 tumors (38,5%) oscil·lava entre un 12% i un 20% i en 30 CPCNP (31,3%) el percentatge de cèl·lules en fase S estava per sobre del 20%. La taula 5-11 resumeix aquesta distribució.

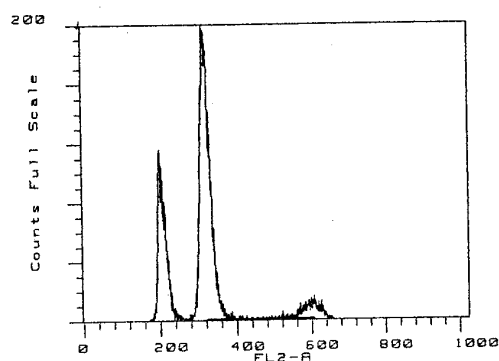
Taula 5-11. Distribució del percentatge de cèl·lules en fase S del tumor primari

% fase S	≤ 12	$> 12 \text{ i } \leq 20$	> 20
Nre. de casos	29	37	30
(%)	(30,2%)	(38,5%)	(31,3%)

Pel que fa als ganglis també es van valorar els resultats obtinguts calculant la mitjana de la fase S entre les mostres de cada CPCNP. Atès el relatiu baix nombre de mostres, va ser més convenient agrupar-los en dues categories, segons si el percentatge de la fase S era alt o baix. Dels 26 ganglis hiliars, 11 casos (42,3%) tenien una fase S baixa i 15 (57,7%), alta. Dels 21 casos de ganglis mediastínics, 15 (71,4%) tenien una fase S baixa i 6 casos (28,6%), alta. A la taula 5-12, està representada aquesta distribució i a les figures 5-14 a la 5-16, hi ha tres exemples de tumors amb la fase S alta, mitjana i baixa.

Taula 5-12. Distribució del percentatge de les cèl·lules en fase S de les metàstasis ganglionars

% fase S	< 12	≥ 12
Ganglis hiliars	11	15
(%)	(42,3%)	(57,7%)
Ganglis mediastínics	15	6
(%)	(71,4%)	(28,6%)



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	85
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	9491
Preparation Date	:	25-JUL-95			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULMON395			
Collection Date	:	25-JUL-95			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 323
 G2+M Peak: 606
 G1 CV : 4.2
 G2+M/G1 Ratio : 1.88

Reference Peak Statistics

Region: 182 - 221
 Peak : 201
 CV : 3.2
 Events: 2251

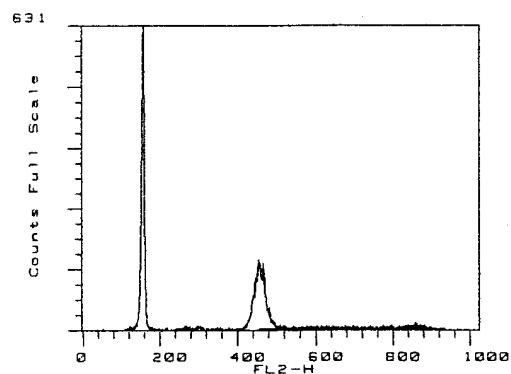
Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.61
 Ratio of CV's : 1.3
 Ratio of Events : 2.7

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5988	86.9
S	232	3.4
G2+M	669	9.7
Total:	6889	100.0

Figura 5-14. Tumor aneuploide amb una fase S baixa (S = 3,4%) i amb un índex de DNA (íDNA = 1,6)



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	CANCER PULMON	Event Rate	:	66
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	13070
Preparation Date	:	18-OCT-94			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULMON063			
Collection Date	:	18-OCT-94			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 456
 G2+M Peak: 888
 G1 CV : 3.0
 G2+M/G1 Ratio : 1.95

Reference Peak Statistics

Region: 144 - 168
 Peak : 156
 CV : 2.6
 Events: 5447

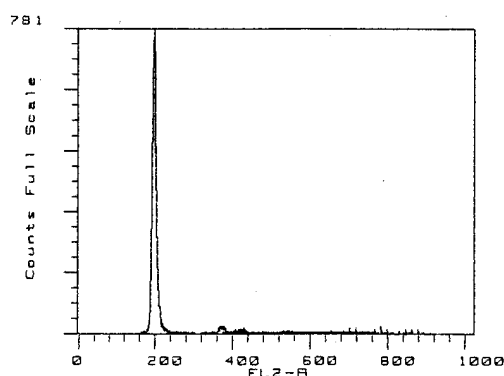
Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 2.92
 Ratio of CV's : 1.2
 Ratio of Events : 0.9

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1 :	4698	69.4
S :	1794	26.5
G2+M :	276	4.1
Total:	6768	100.0

Figura 5-15. Tumor aneuploide amb una fase S mitjana (S = 26,5%) i un índex de DNA alt (iDNA = 2,92)



Patient Name	:		Model	:	RFIT
Case Number	:		Gate	:	1
Tissue Type	:	PULMON	Event Rate	:	93
Preparation	:	VINDELOV	Total Events	:	11373
Preparation Date	:	22-FEB-96			
Reagents	:	DNA			
File Name	:	#3:PULON466			
Collection Date	:	22-FEB-96			
Lab	:	ANATOMIA PATOLOGICA. CITOMETRIA DE FLUJO			

Calculation Parameters (Pop.1)

G1 Peak : 374
 G2+M Peak: 767
 G1 CV : 1.3
 G2+M/G1 Ratio : 2.05

Reference Peak Statistics

Region: 186 - 210
 Peak : 198
 CV : 2.0
 Events: 8948

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.89
 Ratio of CV's : 0.7
 Ratio of Events : 0.1

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	651	49.6
S	655	49.9
G2+M	7	0.5
Total:	1313	100.0

Figura 5-16. Tumor aneuploide amb una fase S alta (S = 49,9%) amb un índex de DNA alt
 (iDNA = 1,89)

5.3.3 Expressió de l'antigen de proliferació cel·lular PCNA per citometria de flux

Per quantificar l'expressió de l'antigen de proliferació cel·lular (PCNA) tant per al tumor primari com per a les metàstasis ganglionars, es va fer servir una immunotinció doble i el sistema informàtic *LYSYS II* (Becton & Dickinson).

Per valorar l'expressió del PCNA es va quantificar el percentatge de cèl·lules PCNA positives a les diferents fases del cicle cel·lular per a cada mostra. Posteriorment es va calcular la mitjana de les diferents mostres de cada cas i per a cada una de les fases del cicle cel·lular. Seguidament es van agrupar els casos en tres categories en funció del valor mitjà del PCNA per a cada una de les fases. Dels 96 casos de tumor primari de CPCNP estudiats, 32 (33,3%) presentaven una expressió de PCNA a la fase G₀–G₁ baixa, 38 (39,6%) amb una expressió mitjana i en 26 casos (27,1%), alta. Per a la fase S, en 31 casos (32,2%) l'expressió de PCNA era baixa, 36 casos (37,5%) amb una expressió moderada i 29 (30,2%) amb una expressió alta. Per a la fase G₂–M, dels 96 casos, 34 (35,4%) tenien una expressió de PCNA baixa, 35 casos (36,5%) amb una expressió moderada i 27 casos (28,1%) amb una expressió de PCNA alta. A les taules 5-13, 5-14 i 5-15 es resumeixen aquests resultats i a les figures 5-17 a 5-19 s'il·lustren diverses mostres representatives.

Taula 5-13. Percentatge de cèl·lules PCNA positives a la fase G₀–G₁ de la població aneuploide (quantificació per CMF)

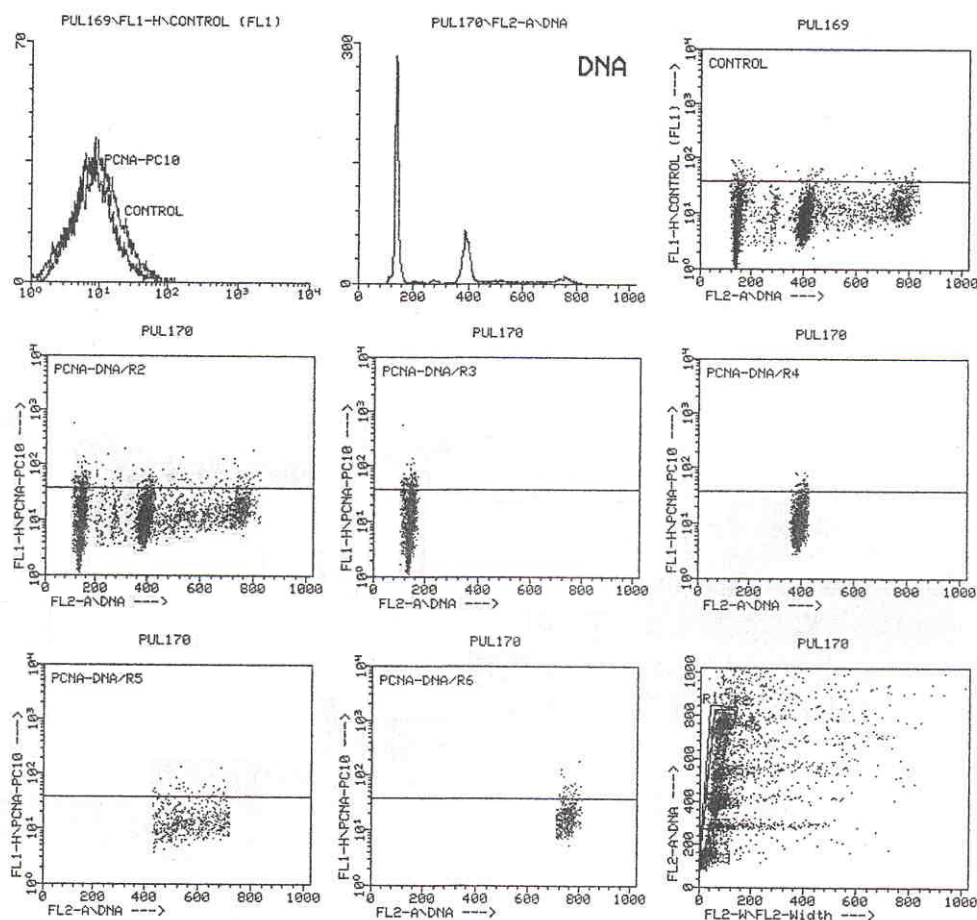
Percentatge de PCNA a la fase G₀–G₁	$> 0 \text{ i } \leq 25$	$> 25 \text{ i } \leq 55$	> 55
Nre. de casos	32	38	26
(%)	(33,3%)	(39,6%)	(27,1%)

Taula 5-14. Percentatge de cèl·lules PCNA positives a la fase S de la població aneuploide (quantificació per CMF)

Percentatge de PCNA a la fase S	$> 0 \text{ i } \leq 50$	$> 50 \text{ i } < 70$	≥ 70
Nre. de casos	31	36	29
(%)	(32,3%)	(37,5%)	(30,2%)

Taula 5-15. Percentatge de cèl·lules PCNA positives a la fase G₂-M de la població aneuploide (quantificació per CMF)

Percentatge de PCNA a la fase G₂-M	$> 0 \text{ i } \leq 55$	$> 55 \text{ i } < 80$	≥ 80
Nre. de casos	34	35	27
(%)	(35,4%)	(36,5%)	(28,1%)



PUL170

----- Quad Stats -----

File: PUL170 Sample:

Date: 5/ 9/95 Gate G2= R2

Parameters: FL2-A(LIN),FL1-H(LOG) Quad Location:

Total= 10000 Gated= 7131

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
2 UR	242	3.39	2.42	341.95	55.63
3 LL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
4 LR	6889	96.61	68.89	276.59	8.86

PUL170

----- Quad Stats -----

File: PUL170 Sample:

Date: 5/ 9/95 Gate G4= R4

Parameters: FL2-A(LIN),FL1-H(LOG) Quad Location:

Total= 10000 Gated= 1885

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
2 UR	32	1.70	0.32	401.62	51.57
3 LL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
4 LR	1853	98.30	18.53	391.57	10.11

PUL170

----- Quad Stats -----

File: PUL170 Sample:

Date: 5/ 9/95 Gate G5= R5

Parameters: FL2-A(LIN),FL1-H(LOG) Quad Location:

Total= 10000 Gated= 524

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
2 UR	33	6.30	0.33	570.54	55.56
3 LL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
4 LR	491	93.70	4.91	567.92	12.78

PUL170

----- Quad Stats -----

File: PUL170 Sample:

Date: 5/ 9/95 Gate G6= R6

Parameters: FL2-A(LIN),FL1-H(LOG) Quad Location:

Total= 10000 Gated= 413

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
2 UR	30	7.26	0.30	764.13	58.36
3 LL	0	0.00	0.00	0.00	1.00
4 LR	383	92.74	3.83	752.05	16.44

Figura 5-17. Tumor amb un percentatge de PCNA global de 4,5% (baix), amb una mitjana de 2,38% a la fase G_0-G_1 , de 10,13% a la fase S i de 8,39% a la fase G_2-M

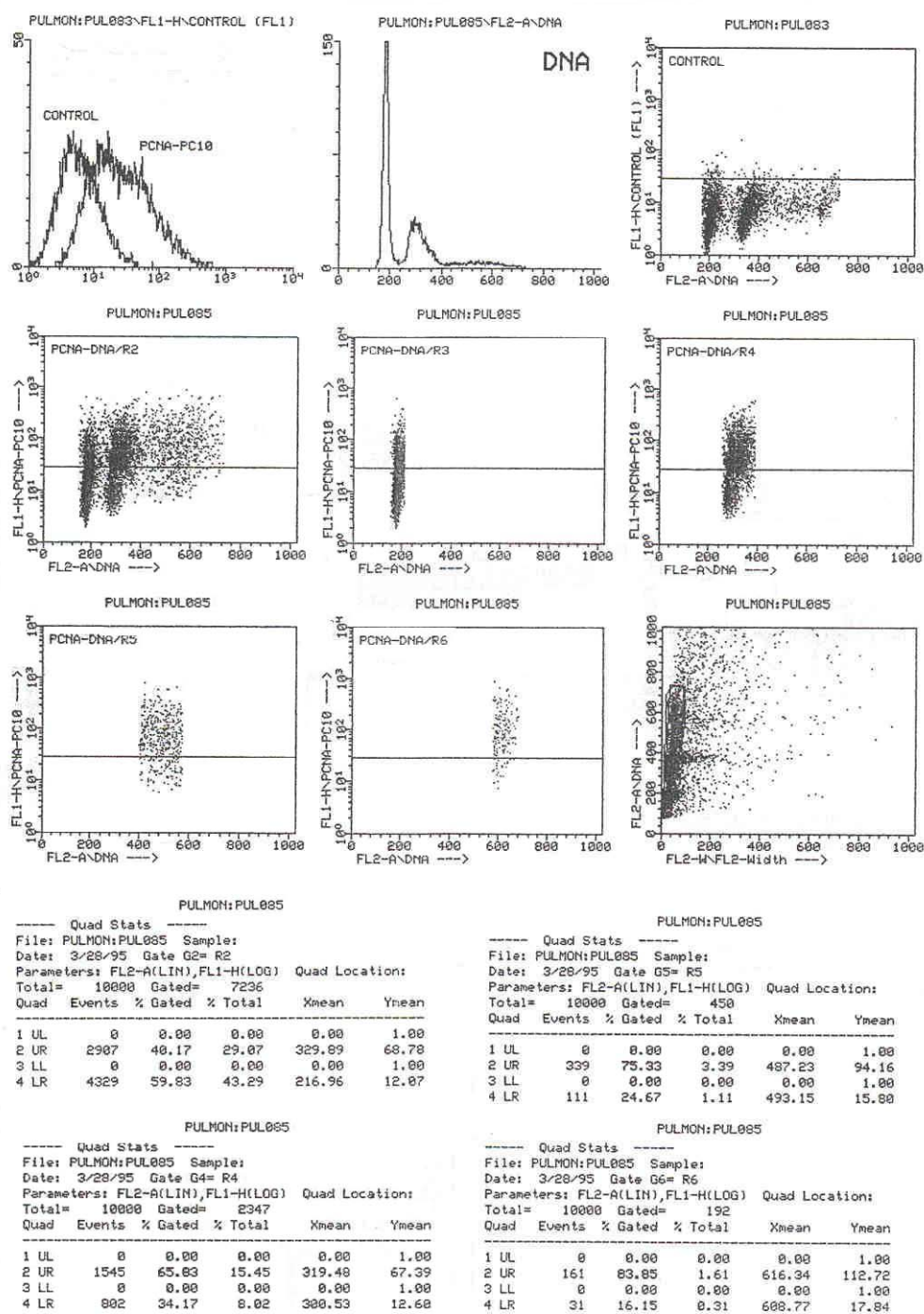


Figura 5-18. Tumor amb un percentatge de PCNA global del 36% (mitjà), amb una mitjana del 45,61% a G₀-G₁, del 72,49% a la fase S i del 59,91% a la fase G₂-M

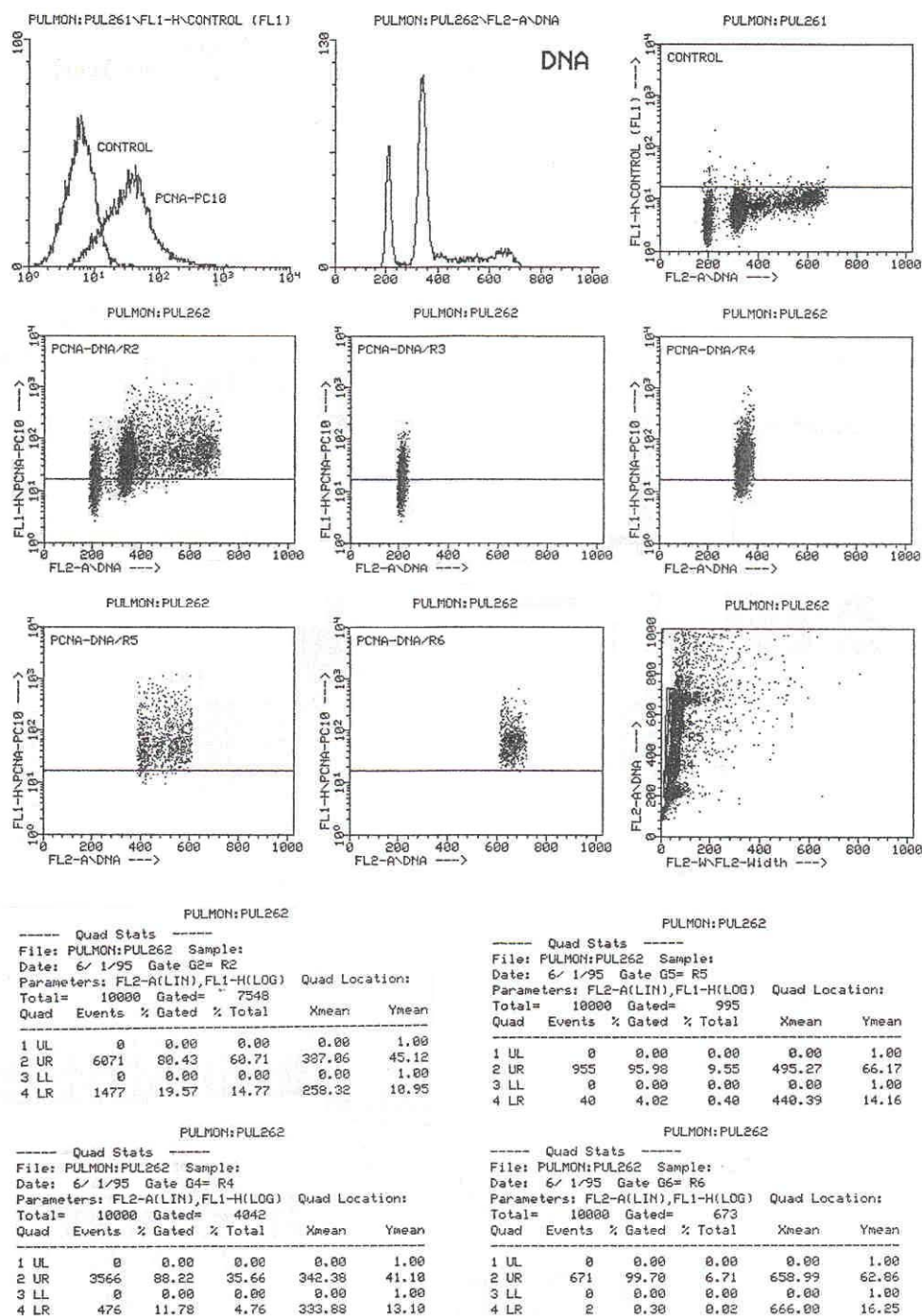


Figura 5-19. Tumor amb un percentatge global de PCNA alt (74,51%) per fases, a G_0 - G_1 hi ha una mitjana del 83,45%, a la fase S del 92,40% i a G_2 -M, del 97,76%

5.4 Variabilitat intratumoral per citometria de flux

Per valorar la variabilitat dels paràmetres obtinguts per citometria de flux es va calcular el coeficient de variació (CV) entre les diferents mostres de cada cas. Així, es va determinar el CV de l'índex de DNA, de la fase S i de la quantificació del PCNA.

5.4.1 Variabilitat intratumoral de la ploïdia

Dels 96 casos de tumor primari, en 23 (24%) el CV va ser de zero, en 51 (53,1%) el CV va ser inferior a 0,07 i en 22 casos (22,9%) el CV va ser superior a 0,07. Els tumors amb un CV de zero no mostren cap diferència entre el nombre de mostres del tumor. Per contra, els tumors amb un CV superior a zero es poden agrupar en dues categories depenent de si el CV és baix ($< 0,07$) o alt ($> 0,07$). Per exemple, un dels CPCNP amb un CV baix ($= 0,0061$) mostra el següent recull d'índexs de DNA: 1,64, 1,65, 1,66, 1,66. En canvi un tumor amb un CV alt ($= 0,3036$) mostra els índexs de DNA següents: 2,50, 1,44, 2,76, 1,54, 2,87. Per tant, els tumors amb un CV $> 0,07$ els podem considerar com a CPCNP molt heterogenis. A la taula 5-16 es presenten aquests resultats i a les figures 5-20 i 5-21, dos exemples de variabilitat alta i baixa.

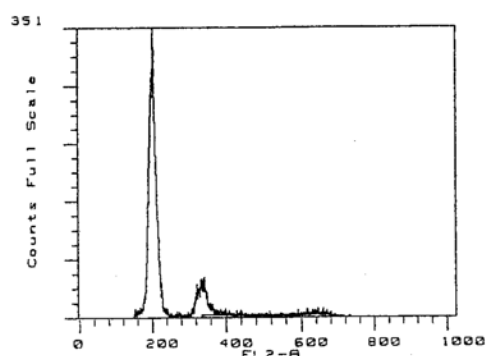
Pel que fa a les metàstasis ganglionars, atès el baix nombre de casos estudiats, es van agrupar en dues categories. Així, dels 47 ganglis, 37 casos (78,7%) no presentaven variació i 10 casos (21,3%) una variació entre moderada i alta. A la taula 5-17 es dona la distribució del CV per als ganglis.

Taula 5-16. CV de la ploïdia en el tumor primari

Ploïdia tumor primari	CV = 0	CV > 0 i $\leq 0,07$	CV > 0,07
Nre. de casos	23	51	22
(%)	(24%)	(53,1%)	(22,9%)

Taula 5-17. CV de la ploïdia a les metàstasis ganglionars

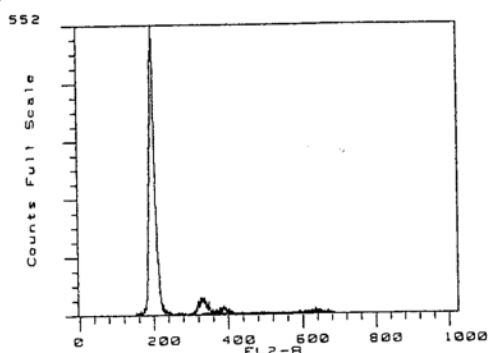
Ploïdia ganglis	CV = 0	CV > 0
Nre. de casos	37	10
(%)	(78,7%)	(21,3%)

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1506	58.5
S	815	31.7
G2+M	253	9.8
Total:	2574	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

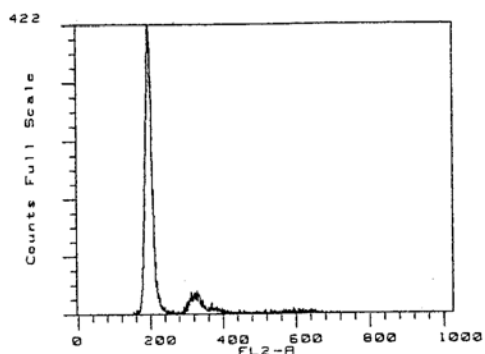
Ratio of Peaks : 1.66
 Ratio of CV's : 0.6
 Ratio of Events : 0.2

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1060	54.4
S	667	34.3
G2+M	220	11.3
Total:	1947	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

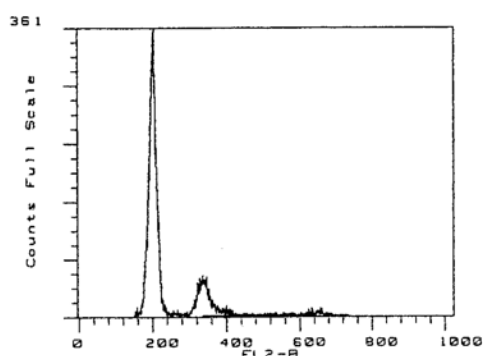
Ratio of Peaks : 1.65
 Ratio of CV's : 0.7
 Ratio of Events : 0.1

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1408	67.8
S	431	20.8
G2+M	238	11.5
Total:	2077	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.64
 Ratio of CV's : 0.8
 Ratio of Events : 0.2

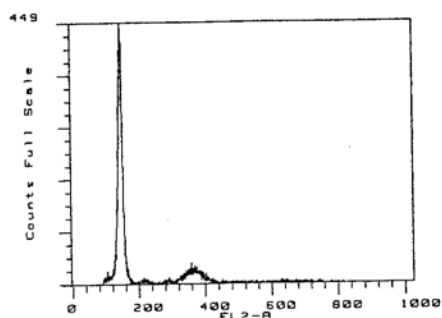
Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	2027	68.8
S	616	20.9
G2+M	305	10.3
Total:	2948	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 1.66
 Ratio of CV's : 0.9
 Ratio of Events : 0.2

Figura 5-20. Tumor primari amb un CV intratumoral baix, CV = 0,0061. Tumor amb quatre mostres i amb un índex de DNA d'1,64, 1,65, 1,66 i 1,66, respectivament

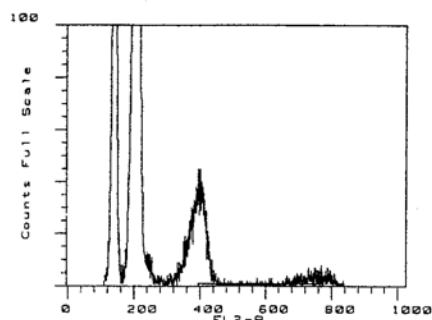


Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	6464	72.8
S	312	3.5
G2+M	2102	23.7
Total:	8878	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks	: 1.44
Ratio of CV's	: 1.2
Ratio of Events	: 2.0

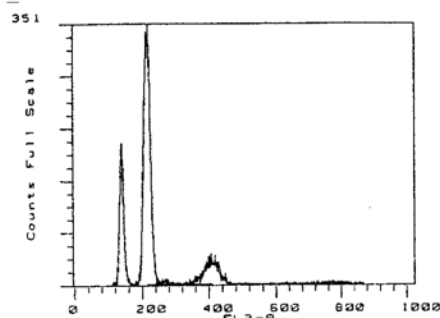


Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1856	81.6
S	171	7.5
G2+M	248	10.9
Total:	2275	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks	: 1.54
Ratio of CV's	: 1.2
Ratio of Events	: 3.1

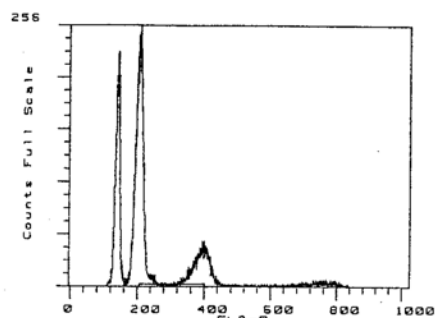


Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1533	71.9
S	437	20.5
G2+M	162	7.6
Total:	2132	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks	: 2.50
Ratio of CV's	: 1.4
Ratio of Events	: 0.2

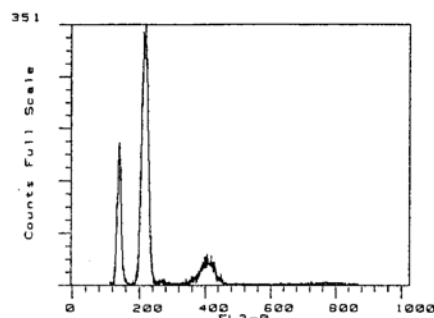


Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	1782	76.2
S	202	8.6
G2+M	354	15.1
Total:	2338	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks	: 2.76
Ratio of CV's	: 0.5
Ratio of Events	: 0.5



Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	8224	79.8
S	332	3.2
G2+M	1752	17.0
Total:	10308	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks	: 2.87
Ratio of CV's	: 1.3
Ratio of Events	: 0.7

Figura 5-21. Tumor primari amb un CV intratumoral alt, CV = 0,3036. Tumor amb 3 mostres, una amb un índex de DNA de 2,50; i dues de multiploides amb un índex de DNA de 1,44 i 2,76 i 1,54 i 2,87, respectivament

5.4.2 Variabilitat de la fase S per CMF

La variabilitat obtinguda per la fase S del tumor primari va ser de zero en 8 casos (8,3%). Entre petita i moderada en 65 casos (67,7%) amb un CV per sota de 0,4 i gran en 23 casos (24%) amb un CV per sobre de 0,4. A la taula 5-18 es presenta la distribució de la fase S de la ploïdia del tumor primari en funció del CV, a les figures 5-22 i 5-23 es mostren uns exemples de variabilitat alta i baixa.

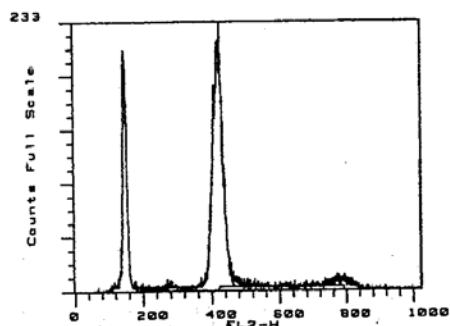
En el cas dels ganglis, es van fer dos grups, els que tenien variabilitat alta i els que no en tenien, i es van obtenir 35 casos (74,5%) sense variabilitat i 12 casos (25,5%) amb una variabilitat alta. Els resultats es poden veure a la taula 5-19.

Taula 5-18. CV de la fase S en el tumor primari

Fase S tumor primari	CV = 0	CV > 0 i ≤ 0,4	CV > 0,4
Nre. de casos	8	65	23
(%)	(8,3%)	(67,7%)	(24%)

Taula 5-19. CV de la fase S a les metàstasis ganglionars

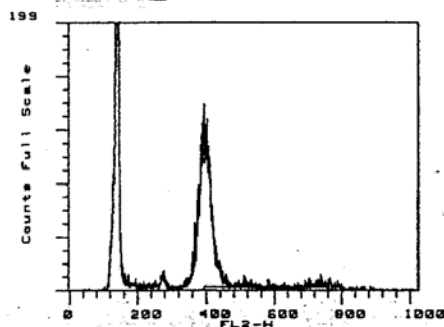
Fase S ganglis	CV = 0	CV > 0
Nre. de casos	35	12
(%)	(74,5%)	(25,5%)

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5804	82.2
S	917	13.0
G2+M	340	4.8
Total:	7061	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

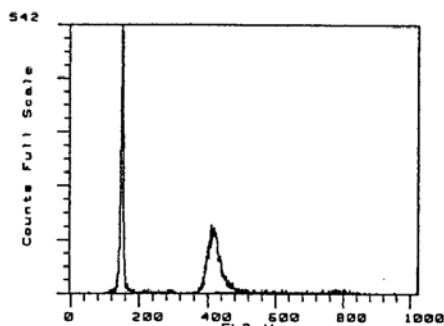
Ratio of Peaks : 2.79
 Ratio of CV's : 1.4
 Ratio of Events : 1.3

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5617	79.1
S	1193	16.8
G2+M	287	4.0
Total:	7097	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

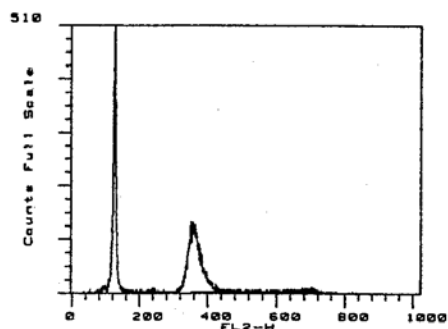
Ratio of Peaks : 2.73
 Ratio of CV's : 1.4
 Ratio of Events : 1.8

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	7752	80.8
S	1196	12.5
G2+M	643	6.7
Total:	9591	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

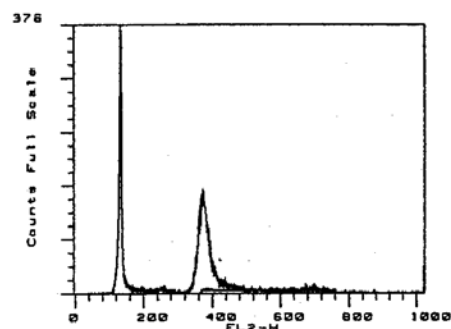
Ratio of Peaks : 2.85
 Ratio of CV's : 0.8
 Ratio of Events : 2.6

Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5307	81.9
S	861	13.3
G2+M	315	4.9
Total:	6483	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

Ratio of Peaks : 2.77
 Ratio of CV's : 1.2
 Ratio of Events : 1.3

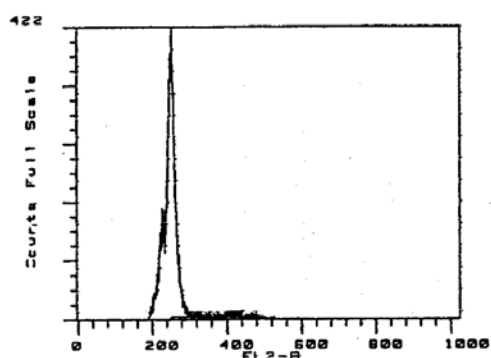
Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5836	84.3
S	1003	14.5
G2+M	84	1.2
Total:	6923	100.0

Peak Relationships (Pop.1 G1/Refer G1)

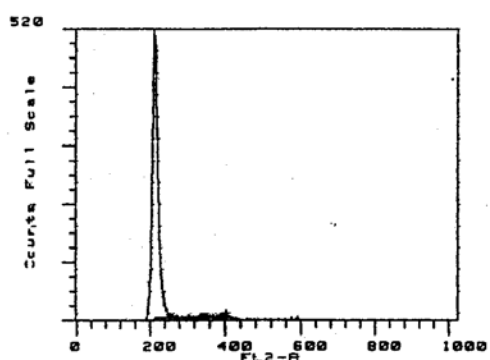
Ratio of Peaks : 2.77
 Ratio of CV's : 1.4
 Ratio of Events : 1.4

Figura 5-22. Fase S amb un CV baix, CV = 0,1227. Tumor amb 5 mostres amb un percentatge de fase S de 12,5%, 13%, 13,3%, 14,5% i 16,8% respectivament



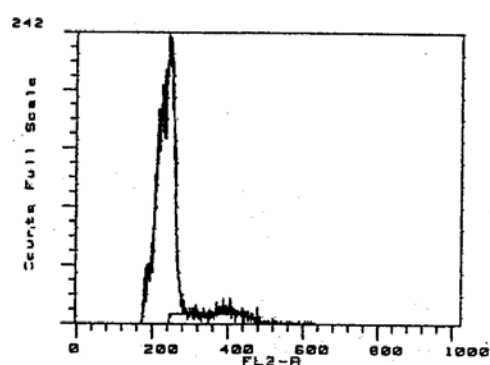
Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	9216	87.5
S	1113	10.6
G2+M	198	1.9
Total:	10527	100.0



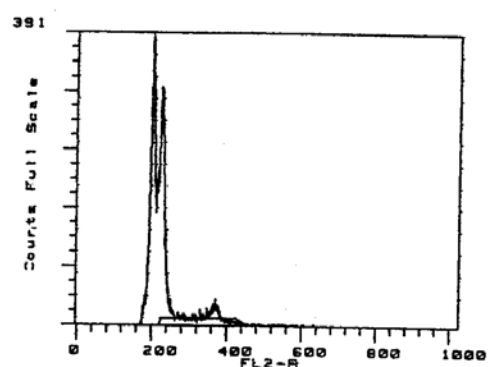
Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	9447	87.1
S	1054	9.7
G2+M	346	3.2
Total:	10847	100.0



Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	5723	73.7
S	1522	19.6
G2+M	516	6.6
Total:	7761	100.0



Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	6108	72.3
S	2139	25.3
G2+M	203	2.4
Total:	8450	100.0

Figura 5-23. Fase S amb un CV alt, $CV = 0,4589$. Tumor de 4 mostres amb un percentatge de fase S de 9,7%, 10,6%, 19,6% i 25,3% ,respectivament

5.4.3 Variabilitat en el PCNA per citometria de flux

Amb la finalitat de valorar el grau d'heterogeneïtat en el percentatge de cèl·lules PCNA positives, s'ha calculat el CV entre les diferents mostres de tumor primari i per a cada una de les fases del cicle cel·lular (G_1 , S, G_2-M). Així, a la fase G_1 de la població aneuploide es troben 33 casos (34,4%) on hi ha molta variabilitat, ($CV > 0,42$). En 53 casos (55,2%) la variabilitat era intermèdia ($CV > 0$ i $< 0,42$). En 10 casos (10,4%) la variabilitat era nul·la ($CV = 0$).

A la fase S, 30 tumors (31,3%) amb una variabilitat alta ($CV > 0,28$), en 56 (58,3%) la variabilitat era menor ($CV > 0 < 0,28$) i en 10 tumors (10,4%) no hi havia variabilitat.

A la fase G_2-M en 36 casos (37,5%) la variabilitat era alta amb un CV per sobre de 0,25, en 50 casos (52%) la variabilitat era moderada ($CV > 0$ i $< 0,25$), i en 10 casos (10,4%) no hi havia variabilitat. Es resumeixen aquests resultats a les taules 5-20, 5-21 i 5-22.

Taula 5-20. CV del PCNA de la població aneuploide del tumor primari a la fase G_0-G_1

PCNA / DNA- G_1	CV = 0	CV > 0 i < 0,42	CV $\geq$ 0,42
Nre. de casos	10	53	33
(%)	(10,4%)	(55,2%)	(34,4%)

Taula 5-21. CV del PCNA de la població aneuploide del tumor primari a la fase S

PCNA / DNA-S	CV = 0	CV > 0 i $\leq 0,28$	CV > 0,28
Nre. de casos	10	56	30
(%)	(10,4%)	(58,3%)	(31,3%)

Taula 5-22. CV del PCNA de la població aneuploide del tumor primari a la fase G₂-M

PCNA/DNA-G ₂ -M	CV = 0	CV > 0 i < 0,25	CV $\geq 0,25$
Nre. de casos	10	50	36
(%)	(10,4%)	(52,1%)	(37,5%)

A la majoria de les mostres ganglionars, 36 casos (76,6%), el CV és igual a zero, és a dir no hi ha variació. A la resta, 11 casos (23,4%), el CV varia de valors baixos a alts. A la taula 5-23 es resumeixen els resultats.

Taula 5-23. CV del PCNA dels ganglis metastàsics

PCNA / DNA G₁, S, G₂-M	CV = 0	CV > 0
Nre. de casos	36	11
(%)	(76,6%)	(23,4%)

A les figures de la 5-24 a la 5-29 es mostren uns exemples de CV baix per a cada fase del cicle respecte del PCNA i un altre de CV alt.

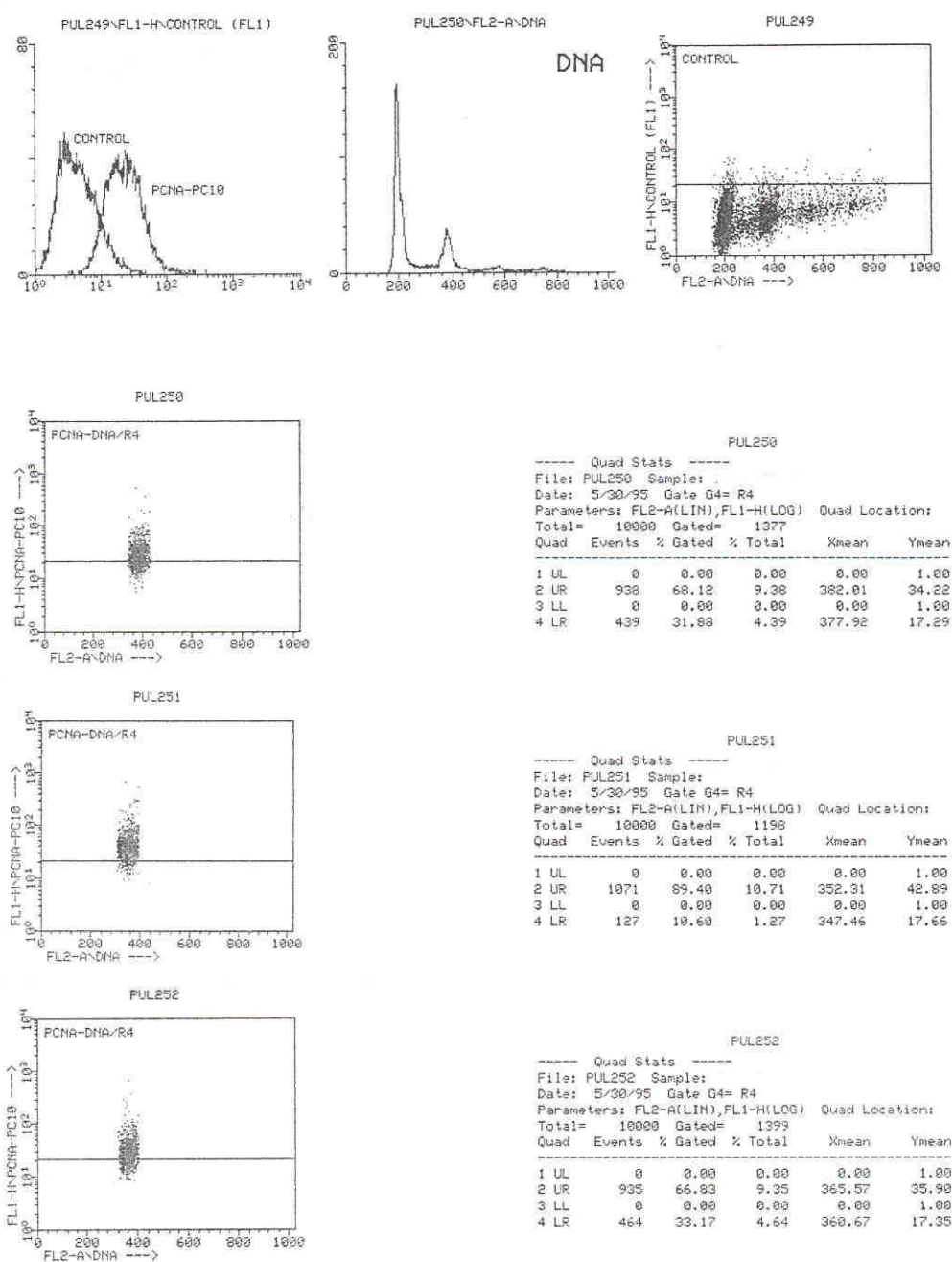


Figura 5-24. Fase G₁-PCNA / DNA amb un CV baix, (CV = 0,1694), amb tres mostres i un percentatge de G₁ de 68,12%, 66,83% i 89,40%, respectivament

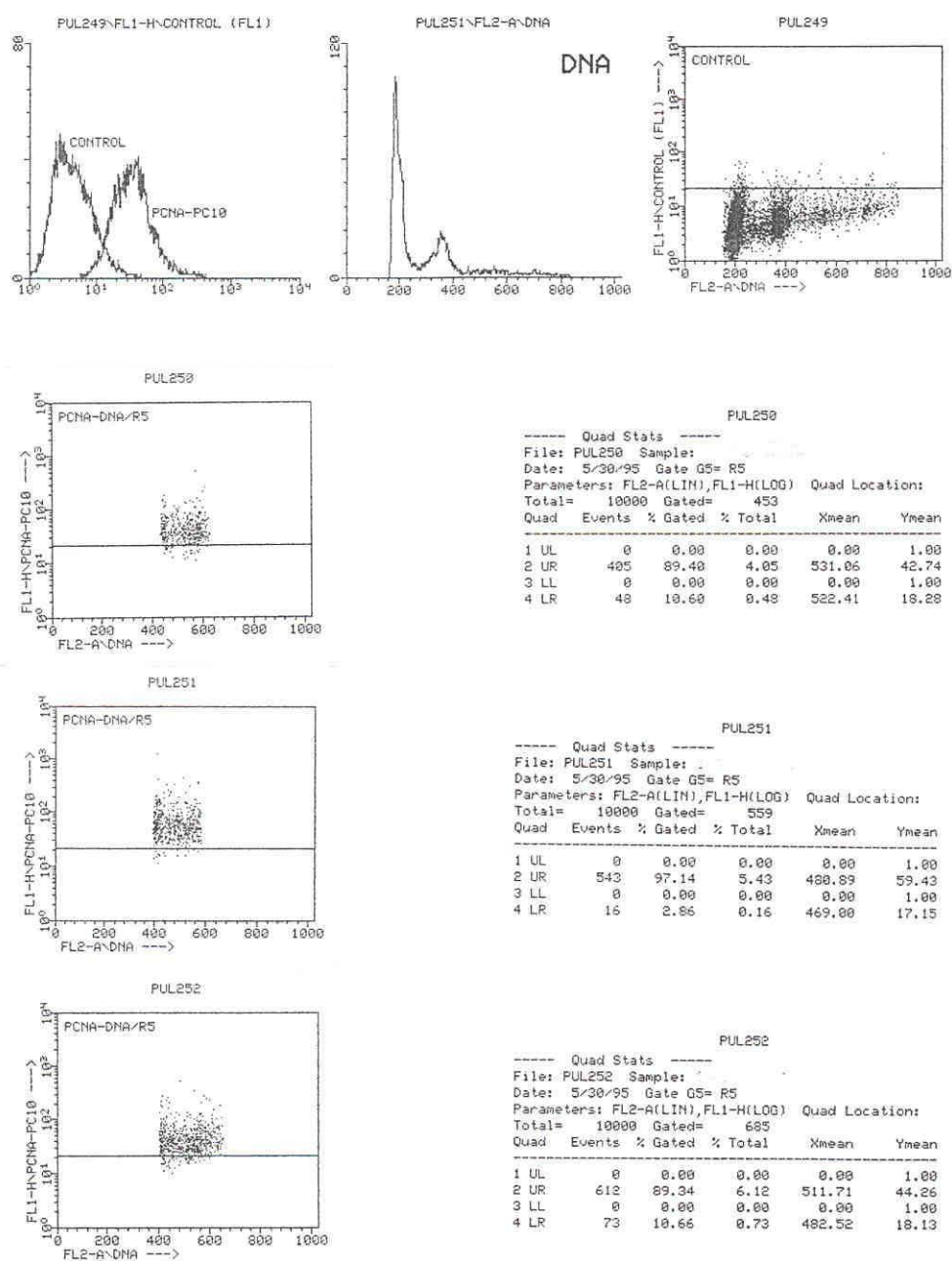


Figura 5-25. Fase S-PCNA / DNA amb un CV baix ($CV = 0,0488$) amb tres mostres i un percentatge de fase S de 89,34%, 89,40% i 97,14%, respectivament

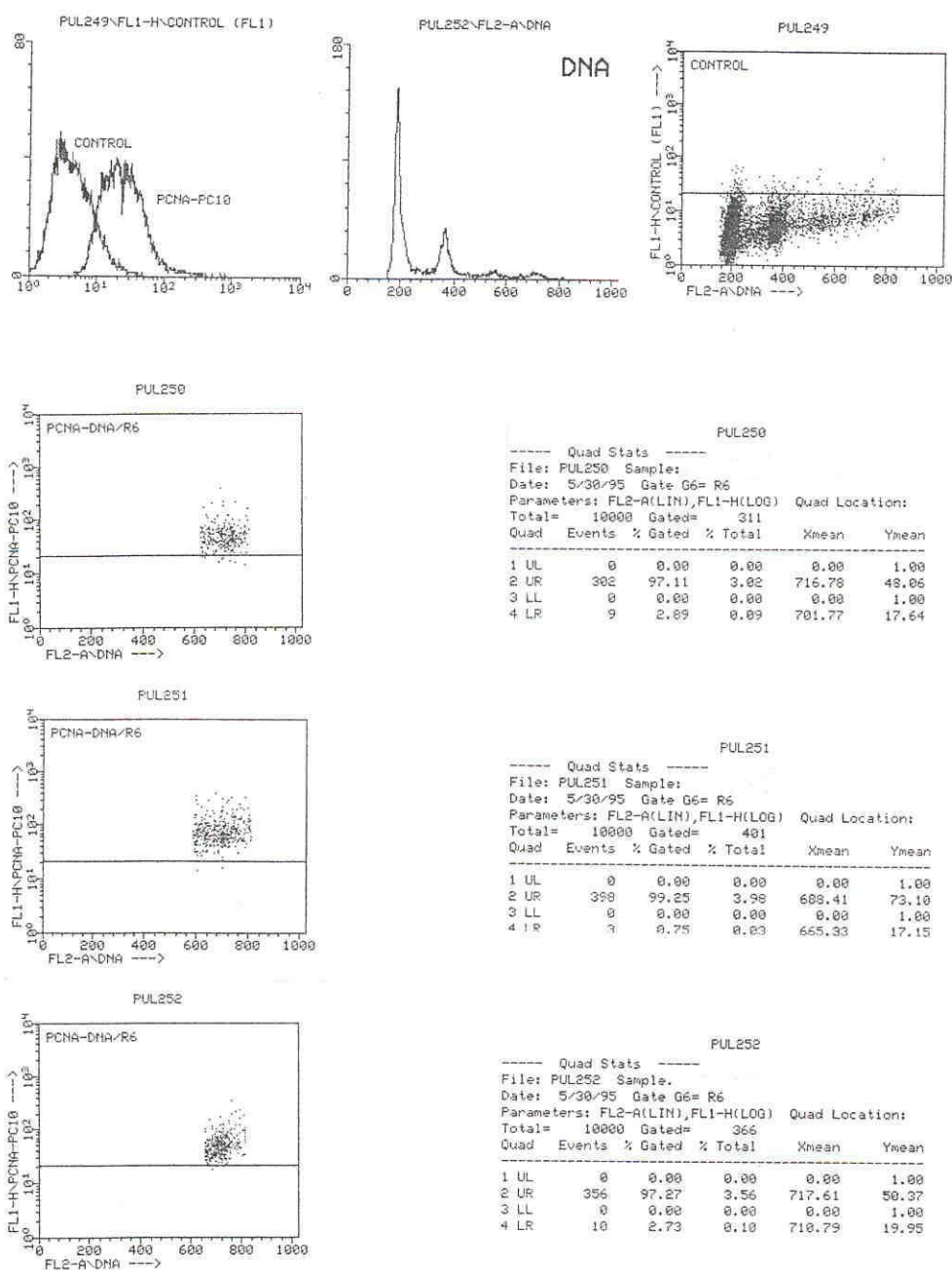


Figura 5-26. Fase G₂-M – PCNA / DNA amb un CV baix (CV = 0,0122) amb tres mostres i un percentatge de fase G₂M de 97,11%, 97,27% i 99,25%, respectivament

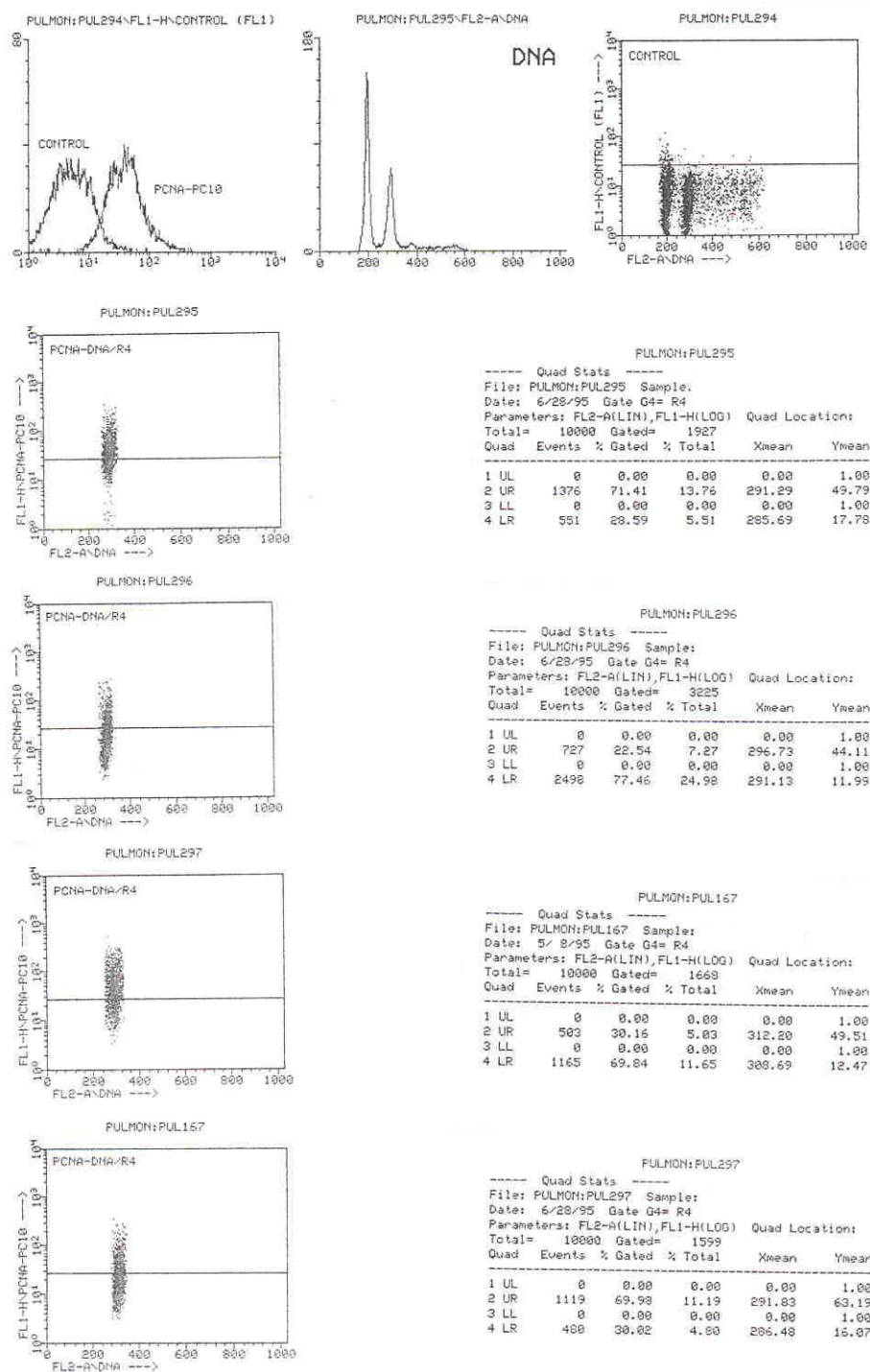


Figura 5-27. Fase G₁ –PCNA / DNA amb un CV alt (CV = 0,5317) amb 4 mostres i un percentatge de fase G₁ de 22,54%, 30,16%, 69,98% i 71,41%, respectivament

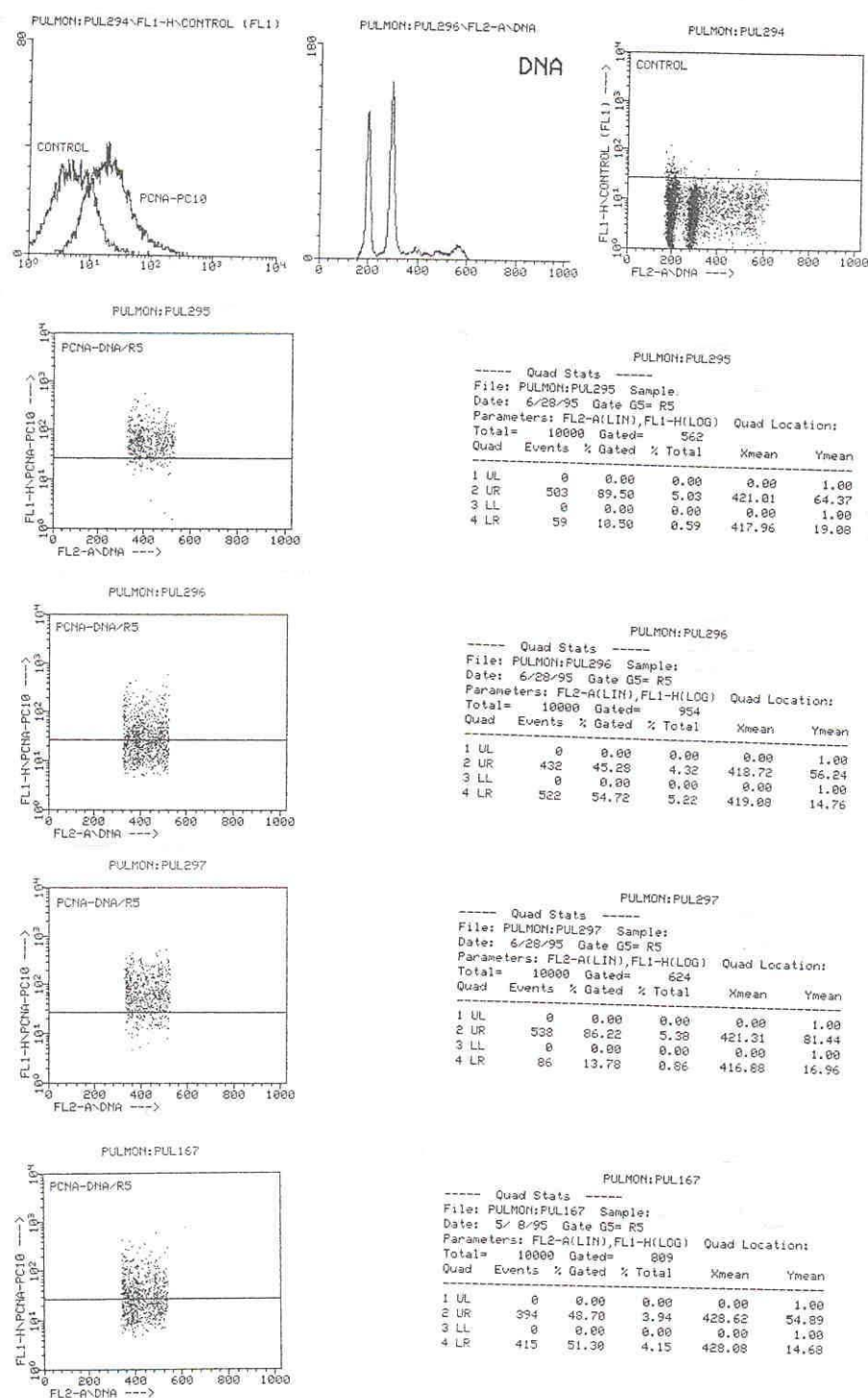


Figura 5-28. Fase S-PCNA / DNA amb un CV alt ($CV = 0,3512$) amb 4 mostres i un percentatge de fase S de 45,28%, 48,70%, 86,22% i 89,50%, respectivament

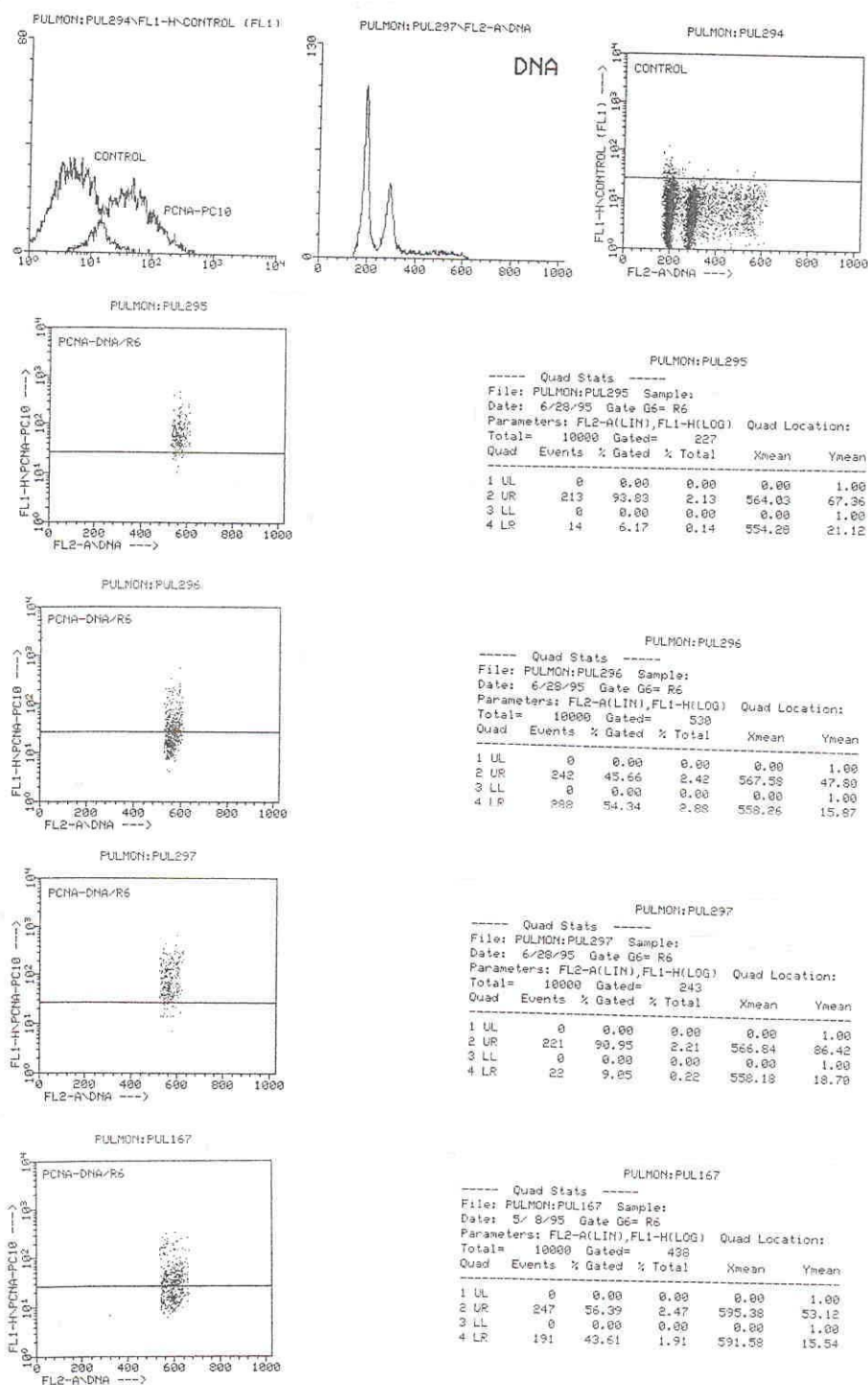


Figura 5-29. Fase G₂-M-PCNA / DNA amb un CV alt (CV = 0,3390) amb 4 mostres i un percentatge de fase G₂-M de 45,66%, 56,39%, 90,95% i 93,83%, respectivament

5.5 Anàlisi estadística

5.5.1 Relació entre variables clinicopatològiques

5.5.1.1 Relació entre l'edat i el tipus histològic

Els malalts amb una edat per sota de 55 anys amb més freqüència (54%) se'ls ha diagnosticat un adenocarcinoma. Per contra, per sobre de 55 anys, el tipus histològic més habitual (64%), ha estat el carcinoma escatós. Aquesta relació entre l'edat i el tipus histològic és estadísticament significativa ($p = 0,01$).

5.5.1.2 Relació entre tipus histològic i estadi clínic

El tipus histològic de carcinoma de pulmó evidencia una certa relació amb l'estadi clínic. Així, els adenocarcinomes són majoritàriament (70%) diagnosticats a l'estadi IIIA. Els carcinomes escatosos i els carcinomes indiferenciats de cèl·lula gran (CICG) mostren una distribució més homogènia entre els diferents estadis. Aquesta relació és estadísticament significativa amb una $p < 0,01$. A la taula 5-24 s'il·lustren aquestes diferències.

Taula 5-24. Taula de freqüències i percentatges entre el tipus histològic i l'estadi patològic

	Adenocarcinoma	Carcinoma escatós	CICG	Total
Estadi I	9 (24%)	22 (41,5%)	3 (33,3%)	34 (34,3%)
Estadi II	2 (5%)	10 (19%)	4 (44,4%)	16 (16,2%)
Estadi IIIA	26 (70%)	21 (40%)	2 (22%)	49 (49,5%)
Total	37 (37,4%)	53 (53,5%)	9 (9,1%)	99 (100%)

5.5.1.3 Relació entre l'estadi clínic i les metàstasis

Com calia esperar, s'ha trobat una relació estadística significativa ($p < 0,01$) entre l'estadi i l'existència de metàstasis, a ganglis hiliars o mediastínics, de tal manera que a l'estadi clínic IIIA el percentatge de carcinomes de pulmó amb metàstasis és del 76% i a l'estadi I de tan sols el 2%.

L'edat no s'ha relacionat, ni amb l'estadi clínic, ni amb les metàstasis. El tipus histològic i les metàstasis no han estat relacionades entre si.

La taula 5-25 recull els valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda de la relació entre les variables clinicopatològiques.

Taula 5-25. Resultats de la χ^2 : valor de la p de les variables clinicopatològiques

	Edat	Tipus histològic	Grau de diferenciació	Estadi clínic	Metàstasis
Edat	-	0,01	NS	NS	NS
Tipus histològic	-	-	NS	< 0,01	NS
Grau de diferenciació	-	-	-	NS	NS
Estadi clínic	-	-	-	-	< 0,01
Metàstasis	-	-	-	-	-

5.5.2 Relació amb les variables immunohistoquímiques

5.5.2.1 Antígens de proliferació cel·lular

Per facilitar les anàlisis estadístiques s'han agrupat els índexs de Ki-67 i de PCNA en tres grups. Per al Ki-67. Grau baix (< 33), mitjà (> 33 i < 46) i alt (> 46). Per al PCNA. Grau baix (< 41), mitjà (> 41 i < 54) i alt (> 54).

5.5.2.1.1. Relació entre l'índex de PCNA i l'índex de Ki-67 amb el tipus histològic

Els índexs de PCNA i de Ki-67 es relacionen significativament amb el tipus histològic CIGC (p PCNA < 0,001 i p Ki-67 = 0,02), de tal manera que habitualment aquest tipus comporta índexs de proliferació més alts (80%). A la

resta de tipus histològics no hi ha una clara relació de dependència amb la proliferació cel·lular.

Taula 5-26. Taula de freqüències i percentatges entre els índexs de PCNA i de Ki-67 amb el tipus histològic

	Adenocarcinoma	Carcinoma escatós	CICG	Total
PCNA alt	8 (22%)	22 (42%)	7 (80%)	37 (37,4%)
Ki-67 alt	5 (13%)	21 (39%)	7 (80%)	33 (33,3%)
PCNA mitjà	16 (43%)	15 (28%)	1 (10%)	32 (32,3%)
Ki-67 mitjà	12 (32%)	19 (35%)	1 (10%)	32 (32,3%)
PCNA baix	13 (35%)	16 (30%)	1 (10%)	30 (30,3%)
Ki-67 baix	20 (54%)	13 (24%)	1 (10%)	34 (34,4%)
Total	37 (37,4%)	53 (53,5%)	9 (9,1%)	99 (100%)
	37 (37,4%)	53 (53,5%)	9 (9,1%)	99 (100%)

5.5.2.1.2. Relació entre l'índex de PCNA i l'índex de Ki-67

En realitzar la recta de regressió s'observa que hi ha una relació directa, de tal manera que quan augmenta l'expressió de PCNA també augmenta la de Ki-67. D'altra banda, a la prova de la χ^2 la $p = 0,052$ i es troba en el límit de la significació estadística.

L'índex de Ki-67 no s'ha pogut relacionar amb el grau de diferenciació ni amb l'estadi clínic ni amb les metàstasis. Tanmateix, l'índex de PCNA no s'ha relacionat ni amb el grau de diferenciació ni amb les metàstasis.

A la taula annexa hi ha el recull dels valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda de les relacions del PCNA i del Ki-67.

Taula 5-27. Resultats de la χ^2 : valor de la p trobat per als antígens de proliferació

	Ki-67	PCNA
Tipus histològic	< 0,001	0,02
Grau de diferenciació	NS	NS
Estadi clínic	NS	NS
Metàstasis	NS	NS
Ki-67	-	0,052

5.5.2.2 Grup de les ciclines

Amb la finalitat de facilitar les anàlisis estadístiques de les variables investigades per immunohistoquímica i citometria de flux s'han establert diverses categories per a cada un dels marcadors de cicle cel·lular. D'aquesta manera s'han pogut comparar diferents variables i establir relacions estadístiques significatives.

5.5.2.2.1. Relació entre ciclina D1 i el grau de diferenciació

Com es pot veure a la taula 5-28, els carcinomes ben diferenciats o moderadament diferenciats amb menys freqüència expressen ciclina D1, de tal manera que els carcinomes escatosos i els adenocarcinomes amb menys signes citoplasmàtics de diferenciació, més freqüentment sobreexpressen ciclina D1 (fig. 5-30). Hi ha una relació significativa entre el grau de diferenciació i la ciclina D1 ($p = 0,03$).

Taula 5-28. Taula de freqüències i percentatges entre l'expressió de la ciclina D1 i el grau de diferenciació

	Ben diferenciat	Moderadament diferenciat	Mal diferenciat	Total
Ciclina D1 ≤ 4	29 (85%)	31 (80%)	15 (58%)	75 (75,8%)
Ciclina D1 > 4	5 (15%)	8 (20%)	11 (42%)	24 (24,2%)
Total	34 (34,3%)	39 (39,4%)	26 (26,3%)	99 (100%)

5.5.2.2.2. Relació entre ciclina E i el tipus histològic

Els carcinomes escatosos i els carcinomes indiferenciats de cèl·lula gran (CICG) mostren amb més freqüència expressió de ciclina E (62% i 89% respectivament); per contra, els adenocarcinomes no s'associen significativament a la ciclina E. Amb els resultats obtinguts de les anàlisis estadístiques s'obté una relació estadísticament significativa entre l'expressió de ciclina E i els tipus histològics, amb una $p = 0,02$. A la taula 5-29 es mostren els resultats obtinguts.

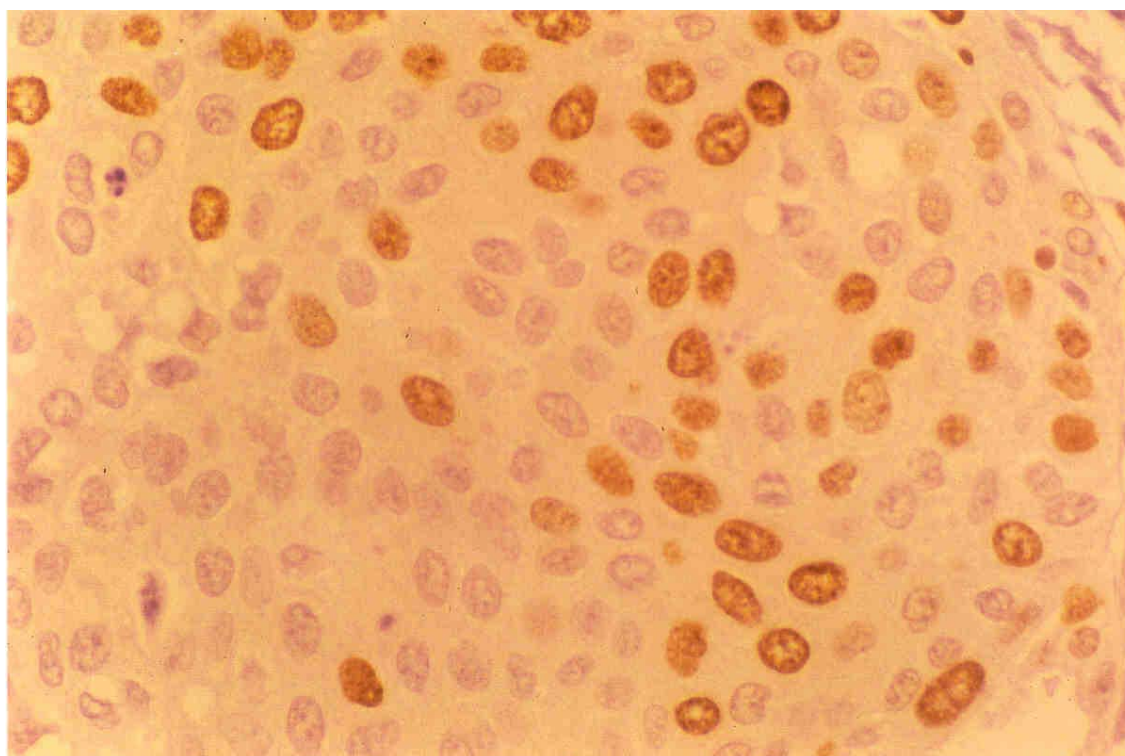


Figura 5-30. Sobreexpressió de ciclina D1 segons tipus histològic

Taula 5-29. Taula de freqüències i percentatges entre la ciclina E i el tipus histològic

	Adenocarcinoma	Carcinoma escatós	CICG	Total
Ciclina E negativa	21 (57%)	20 (38%)	1 (11%)	42 (42,4%)
Ciclina E positiva	16 (43%)	33 (62%)	8 (89%)	57 (57,6%)
Total	47 (47,4%)	53 (53,5%)	9 (9,1%)	99 (100%)

5.5.2.2.3. Relació entre ciclina E i l'índex de Ki-67

Els tumors que tenen un índex de Ki-67 alt (> 46) amb més freqüència sobreexpressen ciclina E (76%). Per contra, quan els índexs de Ki-67 són entre moderats o baixos, el percentatge de tumors positius per a la ciclina E baixa. Un cop feta l'anàlisi estadística s'ha trobat una relació significativa entre la ciclina E i l'expressió de l'índex de Ki-67 ($p = 0,02$). A la taula 5-30 es mostren els resultats d'aquesta relació.

Taula 5-30. Taula de freqüències i percentatges entre l'expressió de la ciclina E i l'índex de Ki-67

	Ki-67 baix	Ki-67 moderat	Ki-67 alt	Total
Ciclina E negativa	19 (45%)	15 (47%)	8 (24%)	42 (42,4%)
Ciclina E positiva	15 (44%)	17 (53%)	25 (76%)	57 (57,6%)
Total	34 (34,4%)	32 (32,3%)	33 (33,3%)	99 (100%)

La ciclina D1 no ha tingut cap relació estadísticament significativa amb el tipus histològic, estadi clínic o metàstasis, tampoc amb l'índex de Ki-67, ni amb l'índex de PCNA. D'altra banda, la ciclina E no s'ha relacionat amb el grau de diferenciació, l'estadi clínic i les metàstasis, ni tampoc amb l'índex de PCNA ni amb la ciclina D1.

5.5.2.3 Proteïna p53

Per facilitar les anàlisis estadístiques s'han agrupat en dues categories, segons si la immunoexpressió fos negativa (= 0) o positiva (per sobre de zero).

5.5.2.3.1. Relació entre la p53 i la ciclina E

Els tumors que són negatius per a la p53 amb més freqüència són negatius per a la ciclina E i viceversa. S'ha trobat que hi ha una relació estadísticament significativa entre l'expressió de la proteïna p53 i de la ciclina E amb una $p = 0,02$. A la taula 5-31 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 5-31. Taula de freqüències i percentatges entre l'expressió de la proteïna p53 i la ciclina E

	p53 negativa	p53 positiva	Total
Ciclina E negativa	17 (63%)	25 (35%)	42 (42,4%)
Ciclina E positiva	10 (37%)	47 (65%)	57 (57,6%)
Total	27 (27,3%)	72 (72,7%)	99 (100%)

La p53 no té cap relació significativa amb el tipus histològic, tampoc amb el grau de diferenciació, ni amb l'estadi clínic, ni amb les metàstasis. Tampoc no se n'ha trobat amb l'índex de PCNA, Ki-67, ni amb la ciclina D1.

A continuació, a la taula 5-32 es recull els valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda de les ciclines i la proteïna p53.

Taula 5-32. Resultats de la χ^2 : valor de la p trobat amb les ciclines i amb la proteïna p53

	Ciclina D1	Ciclina E	Proteïna p53
Tipus histològic	NS	0,02	NS
Grau de diferenciació	0,03	NS	NS
Estadi	NS	NS	NS
Metàstasis	NS	NS	NS
Ki-67	NS	0,02	NS
PCNA	NS	NS	NS
Ciclina D1	-	NS	NS
Ciclina E	-	-	0,02

5.5.3 Relacions de les variables de citometria de flux

S'han comparat els diferents índexs de DNA agrupant-los en tres categories: índex de DNA igual a la unitat, superior a 1 i inferior a 1,6, i superior a 1,6.

De la mateixa manera per a la fase S s'han definit els grups següents: menor del 12%, entre el 12% i el 20% i el tercer grup per sobre del 20%.

5.5.3.1 Relacions amb les variables clíniques

L'índex de DNA i la fase S no s'han relacionat estadísticament amb el tipus histològic, el grau de diferenciació, l'estadi clínic i les metàstasis.

5.5.3.2 *Relacions amb les variables d'immunohistoquímica*

L'índex de DNA i la fase S tampoc no s'han relacionat estadísticament amb les variables immunohistoquímiques estudiades (Ki-67, PCNA, ciclina D1, ciclina E i proteïna p53).

5.5.3.3 *Relació entre la fase S(M) i l'índex de DNA(M)*

Els tumors amb un índex de DNA alt, amb més freqüència la seva fase S és elevada (64%). Quan els tumors tenen un índex de DNA baix, la fase S més sovint també és baixa (45%). Dels resultats obtinguts es pot afirmar que la relació entre aquestes dues variables és estadísticament significativa amb una $p < 0,0001$. Quan es realitza la recta de regressió s'observa que tenen una relació directa així, quan una augmenta o disminueix, l'altra també ho fa. Seguidament, la taula 5-33 es mostren els resultats d'aquesta relació.

Taula 5-33. Taula de freqüències i percentatges entre l'índex de DNA i la fase S per citometria de flux

	Índex DNA = 1	Índex DNA > 1 ≤ 1,6	Índex DNA > 1,6	Total
Fase S baixa	13 (45%)	7 (24%)	9 (31%)	29 (30,2%)
Fase S mitja	2 (5%)	15 (40%)	20 (54%)	37 (38,5%)
Fase S alta	1 (3%)	10 (33%)	19 (64%)	30 (31,3%)
Total	16 (16,7%)	32 (33,3%)	48 (50%)	96 (100%)

A la taula 5-34 es recullen els valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda de totes les variables que s'han relacionat amb la ploïdia.

Taula 5-34. Resultats de la χ^2 : valor de la p trobada amb les variables de la ploïdia

	Índex DNA	fase S
Tipus histològic	NS	NS
Grau de diferenciació	NS	NS
Estadi	NS	NS
Metàstasis	NS	NS
KI-67	NS	NS
PCNA	NS	NS
Ciclina D1	NS	NS
Ciclina E	NS	NS
p53	NS	NS
Índex DNA	-	< 0,0001

5.5.3.4 Relacions entre la variable cicle cel·lular / PCNA i les variables clíniques

Per valorar la relació de l'expressió del PCNA-PC10 per citometria de flux i les altres variables s'ha procedit a classificar els tumors en funció que l'expressió del PCNA fos baixa, mitjana, o alta a cada una de les fases del cicle (G_0 – G_1 , S i G_2 –M).

5.5.3.4.1 Relació entre la fase G₀–G₁ i el tipus histològic

Dels tres tipus histològics, l'adenocarcinoma és el que amb més freqüència té una expressió baixa de PCNA a la fase G₀–G₁. Per contra, els CICG són el tipus histològic que més PCNA expressen a la fase G₀–G₁ ($p = 0,02$). A la taula 5-35 s'hi donen els resultats.

Taula 5-35. Taula de freqüències i percentatges entre l'expressió de PCNA-PC10 a la fase G₀–G₁ i el tipus histològic

	PCNA / G ₀ –G ₁ ≤ 25%	PCNA / G ₀ –G ₁ > 25% i ≤ 55%	PCNA / G ₀ –G ₁ > 55%	Total
Adenocarcinoma	18 (48,7%)	8 (21,6%)	11 (29,7%)	37 (37,4%)
Carcinoma escatós	16 (30,2%)	23 (43,4%)	14 (26,4%)	53 (53,5%)
CICG	1 (11%)	7 (78%)	1 (11%)	9 (9,1%)
Total	35 (35,3%)	38 (38,4%)	26 (26,3%)	99 (100%)

No s'ha trobat relació entre l'expressió de PCNA a la fase G₀–G₁ i el grau de diferenciació, l'estadi clínic i les metàstasis. Tampoc no s'ha trobat cap relació significativa entre l'expressió de PCNA a les fases S i G₂–M i les diferents variables clinicopatològiques (tipus histològic, grau de diferenciació, estadi clínic i metàstasis).

5.5.3.5 Relacions entre la variable cicle cel·lular / PCNA i les variables per immunohistoquímica

No s'ha trobat cap relació entre l'expressió de PCNA a les tres fases del cicle (G_0 – G_1 , S i G_2 –M) i les variables per immunohistoquímica estudiades (Ki-67, PCNA, ciclina D1, ciclina E i proteïna p53).

5.5.3.6 Relacions entre la variable cicle cel·lular / PCNA i les variables de ploïdia, per CMF

5.5.3.6.1 Relació entre fase S / PCNA i S(M)

Com calia suposar, hi ha una relació significativa entre el percentatge de cèl·lules PCNA positives a la fase S i el percentatge de cèl·lules en fase S de la ploïdia ($p < 0,01$).

5.5.3.6.2 Relació entre fase S / PCNA i fase G_0 – G_1

S'ha trobat que els tumors que tenen una fase S baixa també tenen una fase G_0 – G_1 baixa. D'altra banda, els tumors amb una fase S alta tenen una fase G_0 – G_1 alta. La relació entre aquestes dues variables és estadísticament significativa amb una $p < 10^{-6}$. A la taula 5-36 es mostren els resultats.

Taula 5-36. Taula de freqüències i percentatges entre l'expressió de PCNA - PC10 a la fase S i la fase G₀-G₁.

	PCNA / G ₀ -G ₁ ≤ 25%	PCNA / G ₀ -G ₁ > 25% i ≤ 55%	PCNA / G ₀ -G ₁ > 55%	Total
PCNA / S ≤ 50%	29 (85%)	6 (16%)	0 (0%)	35 (35,3%)
PCNA / S > 50%-≤ 70%	5 (15%)	25 (70%)	8 (30%)	38 (38,4%)
PCNA / S > 70%	0 (0%)	5 (14%)	21 (70%)	26 (26,3%)
Total	34 (34,3%)	36 (36,4%)	29 (29,3%)	99 (100%)

5.5.3.6.3 Relació entre la fase G₂-M i expressió de PCNA amb les variables de ploïdia

Es troba que l'expressió de PCNA a la fase G₂-M està relacionada estadísticament amb l'índex de DNA ($p = 0,04$), i el percentatge de cèl·lules en fase S ($p = 0,02$).

5.5.3.6.4 Relació entre fase G₂-M i expressió de PCNA a les fases G₀-G₁ i S

Com calia esperar, l'expressió de PCNA a la fase G₂-M està relacionada significativament amb l'expressió de PCNA a la fase G₀-G₁ i S ($p < 10^{-6}$ a tots dos casos).

D'altra banda, no s'ha trobat cap relació significativa entre l'expressió de PCNA a la fase G₀-G₁ i les variables de ploïdia (índex DNA i fase S), tampoc entre

l'expressió de PCNA a la fase S i l'índex DNA.

A la taula 5-37 es recullen els valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda per a cada parell de variables relacionades.

Taula 5-37. Resultats de la χ^2 . Valors de la p entre l'expressió de PCNA i cicle cel·lular

	Fase G₀–G₁ / PCNA	Fase S / PCNA	Fase G₂–M / PCNA
Tipus histològic	0,02	NS	NS
Grau de diferenciació	NS	NS	NS
Estadi	NS	NS	NS
Metàstasis	NS	NS	NS
Ki-67	NS	NS	NS
PCNA	NS	NS	NS
Ciclina D1	NS	NS	NS
Ciclina E	NS	NS	NS
p53	NS	NS	NS
Índex de DNA	NS	NS	0,04
Fase S	NS	< 0,01	0,02
Fase PCNA / G₀–G₁	-	< 10⁻⁶	< 10⁻⁶
Fase PCNA / S	-	-	< 10⁻⁶

5.5.4 Relació entre la variabilitat de l'índex de DNA i les altres variables

5.5.4.1 *Relació entre el CV de l'índex de DNA i el CV de la fase S*

Amb més freqüència els tumors heterogenis per a l'índex de DNA, també ho són per a la fase S ($p < 10^{-6}$).

5.5.4.2 *Relació entre el CV de l'índex de DNA i el CV del PCNA a les fases del cicle*

Els tumors que tenen un CV alt d'índex de DNA, amb més freqüència presenten uns CV de PCNA elevats a les diferents fases del cicle. Per contra, quan els tumors no tenen variabilitat en l'índex de DNA, tampoc no en tenen a l'expressió de PCNA a les diferents fases del cicle. S'ha trobat que hi ha una relació estadísticament significativa entre el CV de l'índex de DNA i els CV de l'expressió de PCNA a les fases ($p < 10^{-4}$).

No es va trobar cap relació significativa entre la variabilitat de l'índex de DNA i les variables clinicopatològiques investigades (edat, estadi, tipus histològic, metàstasis i grau de diferenciació).

Cap de les variables immunohistoquímiques estudiades no s'han relacionat significativament amb la variabilitat de l'índex de DNA (Ki-67, PCNA, ciclina D1 i E, i p53).

Pel que fa a les variables obtingudes per CMF no s'ha trobat cap relació estadística significativa amb el CV dels ganglis hiliars i mediastínics.

5.5.5 Relació entre la variabilitat de la fase S i les altres variables

5.5.5.1 Relació entre el CV de la fase S i l'índex de PCNA per mitjà d'IHQ.

S'ha trobat una relació estadísticament significativa entre els tumors que sobreexpressen PCNA i el CV de la fase S amb una $p = 0,01$.

5.5.5.2 Relació entre el CV de la fase S i l'expressió de PCNA per mitjà de CMF.

Els tumors que tenen un CV de la fase S entre moderat i alt amb més freqüència presenten uns CV de PCNA elevats a les diferents fases del cicle. En canvi, quan els tumors no tenen variabilitat a la fase S, tampoc no en tenen a l'expressió de PCNA a les diferents fases del cicle. S'ha trobat que hi ha una relació estadísticament significativa entre el CV de la fase S i els CV de l'expressió de PCNA a les fases ($p < 10^{-6}$).

No es va trobar cap relació significativa entre la variabilitat de la fase S i les variables clinicopatològiques estudiades (edat, estadi, tipus histològic, metàstasis i grau de diferenciació).

De totes les variables immunohistoquímiques valorades, només va assolir significació estadística el PCNA, la resta no es van relacionar amb la variabilitat de la fase S (Ki-67, ciclina D1 i E i p53).

De totes les variables obtingudes per CMF, no s'ha trobat cap relació estadística significativa amb el CV dels ganglis hiliars i mediastítics. A la taula 5-38 es recullen els valors de la p mitjançant la prova de la χ^2 obtinguda pel coeficient de variació de l'índex de DNA i de la fase S.

Taula 5-38. Resultats de la χ^2 : valor de la p pel coeficient de variació de l'índex de DNA i de la fase S

Variables	CV iDNA	CV fase S
Edat	NS	NS
Estadi	NS	NS
Tipus histològic	NS	NS
Grau de diferenciació	NS	NS
Metàstasis	NS	NS
p53	NS	NS
Ciclina D1	NS	NS
Ciclina E	NS	NS
Ki-67	NS	NS
PCNA	NS	0,01
CV iDNA	-	NS
CV S	$< 10^{-6}$	-
CV G ₀ –G ₁ / PCNA	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$
CV S / PCNA	$< 10^{-4}$	$< 10^{-6}$
CV G ₂ –M / PCNA	$< 10^{-5}$	$< 10^{-6}$

5.5.6 Anàlisi univariable respecte a la supervivència lliure de malaltia

Es va realitzar l'anàlisi univariable i multivariable de la supervivència lliure de malaltia i supervivència global. Dels 99 casos estudiats, 7 es van excloure de l'estudi per manca d'alguna de les variables estudiades. A la taula 5-39 es recullen

els resultats dels 92 casos analitzats per a la supervivència lliure de malaltia. Es pot observar que, de totes les variables, únicament el CV de l'índex de DNA s'ha aproximat a la significació estadística. Els malalts que presenten un coeficient de variació de l'índex de DNA alt en el tumor, tenen més risc de presentar una recidiva que els malalts amb un CV baix o nul, tot i que l'esmentada variable està en el límit de la significació estadística ($p = 0,057$).

Taula 5-39. Resultat de l'anàlisi univariable en relació amb la supervivència lliure de la malaltia

Variables	valor de la <i>P</i>	<i>“HAZD RATIO”</i>
Estadi	0,074	1,426
p53	0,129	0,928
Ciclina D1	0,449	0,940
Ciclina E	0,624	0,960
Ki-67	0,150	1,012
PCNA	0,207	1,008
DNA (M)	0,646	0,817
S (M)	0,492	1,015
CV DNA	0,057	28,03
CV S	0,580	1,846
PCNA cicle (M)	0,732	1,004
CV PCNA cicle	0,378	2,223

5.5.7 Anàlisi univariable respecte a la supervivència global de la malaltia

A la taula 5-40 es presenten els resultats de l'anàlisi univariable per a la supervivència global de la malaltia.

En aquesta anàlisi es presenta l'estadi com a variable relacionada amb el pronòstic de la supervivència global del malalt ($p = 0,013$). Així, a l'estadi IIIA la supervivència del malalt es menor.

Es reforça la significació del CV de l'índex de DNA i s'hi afegeix el CV de la fase S com a variables que estan relacionades amb l'evolució del malalt, de tal manera que l'heterogeneïtat intratumoral per a la ploïdia i la fase S s'associa amb l'escurçament de la vida del malalt ($p = 0,038$ i $p = 0,005$ respectivament).

Taula 5-40. Resultat de l'anàlisi univariable en relació amb la supervivència global de la malaltia

Variables	valor de la <i>P</i>	<i>HAZD RATIO</i>
Estadi	0,013	1,535
p53	0,197	0,946
Ciclina D1	0,605	0,964
Ciclina E	0,517	0,953
Ki-67	0,211	1,009
PCNA	0,809	1,001
DNA (M)	0,129	0,524
S (M)	0,950	1,001
CV DNA	0,038	24,45
CV S	0,005	10,37
PCNA cicle (M)	0,395	1,008
CV PCNA cicle	0,847	1,176

5.5.8 Anàlisi multivariable pel que fa a la supervivència global de la malaltia

A la taula 5-41 hi ha els resultats del model d'anàlisi multivariable per a la supervivència global de la malaltia més adient. L'estadi i el CV per a la fase S són les variables que han assolit un valor pronòstic independent ($p < 0,02$).

Taula 5-41. Resultat de l'anàlisi multivariable de la supervivència global de la malaltia

Variables	Valor de la <i>P</i>	<i>HAZD RATIO</i>
Estadi	0,016	1,547
CV fase S	0,006	11,36