



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

PET/CT como biomarcador precoz de respuesta en pacientes
con metástasis: aportación de los microarrays de expresión
génica

Autora:

Aurora Crespo de la Jara

Directores:

Dr. D. Ramón González Manzano

Dr. D. Antonio Brugarolas Masllorens

Murcia, marzo de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

PET/CT como biomarcador precoz de respuesta en pacientes
con metástasis: aportación de los microarrays de expresión
génica

Autora:

Aurora Crespo de la Jara

Directores:

Dr. D. Ramón González Manzano

Dr. D. Antonio Brugarolas Masllorens

Murcia, marzo de 2017




UCAM


UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. Ramón González Manzano y el Dr. D. Antonio Brugarolas Masllorens, como Directores⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada "PET/CT como biomarcador precoz de respuesta en pacientes con metástasis: aportación de los microarrays de expresión génica" realizada por Dña. Aurora Crespo de la Jara en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 01 de febrero de 2017.


Antonio Brugarolas Masllorens
40246316 L


Ramón González Manzano
51357607-X

⁽¹⁾ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	9
1.1	Metabolismo y cáncer.....	9
1.2	PET-CT y cuantificación.....	16
1.3	Valoración precoz de la respuesta en oncología.....	23
1.4	Microarrays de expresión génica.....	29
2.	Hipótesis, justificación y objetivos.....	33
2.1	Hipótesis.....	33
2.2	Justificación.....	33
2.3	Objetivos.....	34
3.	Pacientes, material y métodos.....	37
3.1	Criterios de inclusión de pacientes.....	37
3.2	Estudio PET-CT.....	38
3.3	Microarrays de expresión génica.....	41
3.3.1	Obtención de las muestras.....	41
3.3.2	Diseño e interpretación.....	41
3.3.3	Análisis estadístico para la elaboración de un modelo predictivo de captación FDG a partir de datos de expresión de microarrays.....	44
4.	Resultados.....	53
4.1	Pacientes del <i>training set</i>	53
4.2	Cuantificación FDG PET/CT.....	54
4.3	Aglomeración jerárquica de las 909 sondas seleccionadas para la elaboración del modelo.....	57
4.4	Procesos biológicos relevantes entre los genes seleccionados.....	60
4.5	Construcción del modelo predictivo.....	68
4.6	Validación externa del modelo predictivo.....	75
4.7	Efectos de la disminución del número de sondas en la eficiencia del modelo predictivo.....	78
5.	Discusión.....	81
5.1	Pacientes del <i>training set</i> y <i>validation set</i>	81

5.2	Cuantificación FDG PET/CT.....	82
5.3	Agrupación jerárquica	83
5.4	Procesos biológicos relevantes	84
5.5	Construcción y validación externa del modelo predictivo	98
6.	Conclusiones	103
7.	Limitaciones y futuras líneas de investigación	105
7.1	Limitaciones	105
7.2	Futuras líneas de investigación.....	106
8.	Anexos	107
8.1	Anexo 1. Listado completo de las 909 sondas seleccionadas para la generación del modelo multivariado con su coeficiente de regresión (CR).	107
8.2	Anexo 2. Resultado del comando <i>sessionInfo()</i> en R versión 3.2.5 con todas las librerías utilizadas en el análisis estadístico de este estudio..	139
8.3	Anexo 3. Autores del <i>software</i> relacionado con el entorno estadístico R usado en este estudio.....	140
8.4	Anexo 4. Listado completo de los procesos biológicos más sobrerrepresentados estadísticamente entre los genes seleccionados para la generación del modelo según aparecen en <i>DAVID Bioinformatics Resources</i> 6.7.	141
8.5	Anexo 5. Fenómenos biológicos más relevantes de los genes incluidos en el modelo según se recogen en el recurso público bioinformático <i>Consensus Pathway Database, release 31</i> (http://ConsensusPathDB.org)..	151
8.6	Anexo 6. Fenómenos biológicos más relevantes de los genes incluidos en el modelo según se recogen en el recurso público bioinformático <i>STRING 10.0</i> (http://string-db.org/).....	158
8.7	Anexo 7. Mapas de interacciones proteína-proteína a partir de los genes incluidos en el modelo según se recogen en el recurso público bioinformático <i>STRING 10.0</i> (http://string-db.org/).....	163
8.8	Anexo 8. <i>Canonical Pathways</i> más significativas obtenidos mediante la aplicación del ssGSEA y su coeficiente de correlación respecto del SUV ($p < 0.05$).....	165

9.	Resumen	173
10.	Abstract.....	175
11.	Abreviaturas utilizadas	177
12.	Lista de Figuras	179
13.	Lista de Tablas	181
14.	Referencias	183
15.	Publicaciones y congresos.....	203

1. INTRODUCCIÓN

1.1 METABOLISMO Y CÁNCER

La glicólisis es la ruta metabólica clave –incluso única en determinados tipos celulares– para la obtención de energía a través de la oxidación de la glucosa, permitiendo la síntesis de macromoléculas y la división y proliferación celular. Los principios básicos de su regulación fueron descifrados por los trabajos pioneros de Warburg, Lenhinger, Krebs, Pasteur, Chance, Petersen, Wein House, y Vaupel entre otros [1]. Más recientemente, Hanahan y cols. publicaron una actualización de su conocida revisión del 2000 “*The Hallmarks of Cancer*” [2], analizando el papel preponderante del metabolismo energético celular en la transformación tumoral. En la actualización de su primera publicación [2a] suman a las 6 conocidas señas de identidad biológica características de la célula transformada en tumoral –señales de proliferación, inhibición de los genes supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacitación de la inmortalidad replicativa, favorecedoras de la angiogénesis y de la invasión y metástasis– otras tres nuevas: reprogramación del metabolismo energético, evitación del sistema inmunológico y creación de un microambiente favorable. Un creciente número de publicaciones apuntan al relevante papel de estas capacidades, y en concreto del metabolismo energético, en la patogénesis de muchos tipos de cáncer y consideran su presencia probablemente universal en todas las células tumorales. En la figura 1 se presenta el esquema tradicional de las *hallmarks of cancer* con las nuevas inclusiones. En el 2013 Sonnenschein y Soto publicaron una revisión crítica sobre “*The Hallmarks of Cancer I y II*” en la que argumentan que la proliferación y la motilidad no son exclusivos de la célula tumoral, sino que están presentes en todas las células, y que la carcinogénesis se debe a alteraciones recíprocas entre las células y en su interacción con la matriz extracelular [3].

En situaciones normales la célula combina la glicólisis citoplásmica y la fosforilación oxidativa en la matriz mitocondrial para obtener su energía. En un primer paso mediante la glicólisis se obtiene ATP, NADH y ácido pirúvico. En presencia de oxígeno se da paso a la respiración oxidativa mitocondrial,

fragmentándose en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), es conocido como ciclo de Krebs. De esta manera, se pueden obtener hasta 38 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa como ganancia neta. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, esta segunda fase da lugar a una fermentación láctica, de menor rendimiento en términos energéticos.

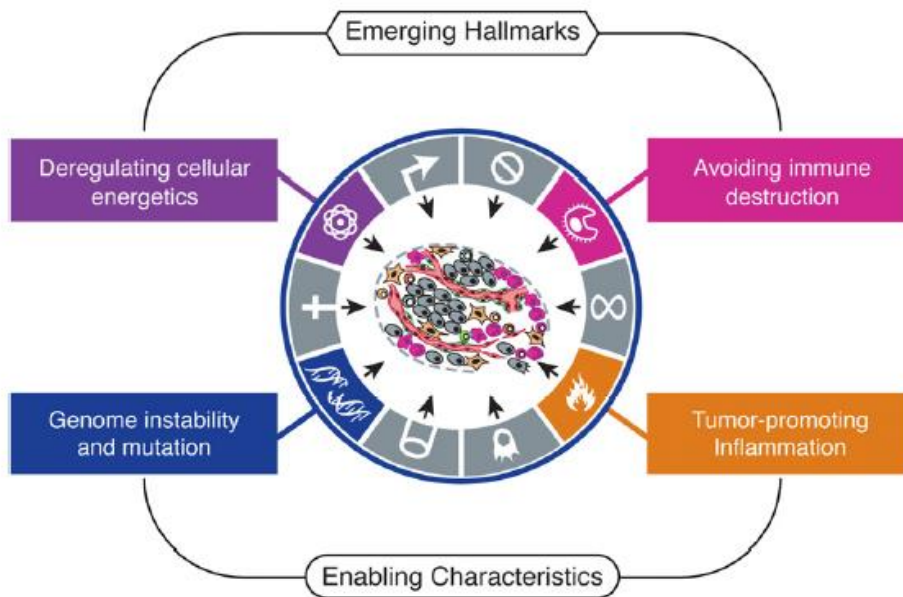


Fig. 1. El cambio del modelo energético, la evasión del control inmune y el microambiente tumoral son las tres señales de identidad de nueva incorporación en cáncer [2a].

Hace más de un siglo, Pasteur fue el primero en poner de manifiesto la relación inversa entre estos dos mecanismos diferentes presentes en el metabolismo de la glucosa. El describió que, en ausencia de oxígeno, se inhibía la vía preferente de la fosforilación oxidativa y se activaba la glicólisis anaeróbica como mecanismo preferente para obtener ATP (el denominado “efecto Pasteur”). En este caso el piruvato sufre una fermentación láctica que permite obtener dos moles de ATP por cada mol de glucosa, por lo que esta vía es poco eficiente respecto a la fase aeróbica de la glicólisis.

Tradicionalmente se ha considerado el cambio en el metabolismo energético de la glucosa como la primera marca identificativa de la célula tumoral, relegando a un segundo plano la fosforilación oxidativa, y dando protagonismo a una glicólisis anaeróbica. En 1931, el premiado con el Nobel en medicina Otto Warburg, descubrió que la célula tumoral, a diferencia de lo que hace la célula normal, utiliza la glicólisis anaeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa mitocondrial incluso en un medio rico en oxígeno (efecto Warburg), de tal forma que se requiere un aumento importante de la captación de glucosa para mantener los requerimientos energéticos celulares, generándose mayoritariamente lactato [4].

En la célula la demanda de energía, los niveles de ciertos metabolitos clave y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), permiten ajustar el flujo de la glicólisis o incluso invertir el proceso (glucogénesis), atendiendo a las necesidades de diferenciación y proliferación, y a la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. El control de la glicólisis se hace a través de la regulación de enzimas clave como la hexoquinasa (HK), la fosfofructokinasa (PFK) y la piruvato kinasa (PK) y de la entrada y salida del azúcar y del lactato a través de sus transportadores GLUT y MCT, respectivamente. La heterogeneidad de las enzimas de la vía glicolítica (consecuencia de la presencia de distintos genes, de variantes en la maduración de su RNA, en su expresión, de modificaciones post-transcripcionales) permite una gran flexibilidad metabólica, asegurando así la capacidad de adaptación celular a las necesidades funcionales de un tejido e incluso su interacción sinérgica con el entorno [5].

Sin embargo, desde que se ha considerado la posibilidad de interrumpir la glicólisis como una terapia anticancerosa profundizándose en sus mecanismos, el paradigma de la glicólisis de la célula tumoral ha cambiado y se ha demostrado que algunas células tumorales mantienen activas altas tasas de fosforilación oxidativa [6]. Se ha observado que no todos los tumores, o incluso no todas las células de un mismo tumor, adoptan una remodelación metabólica clásica según el efecto Warburg, sino que se caracterizan por presentar un fenotipo opuesto de tipo respiratorio, con un incremento en la fosforilación oxidativa mitocondrial [7-9]. En la figura 2 [6] se representan señaladas en rojo las enzimas o transportadores sobre-expresados en la glicólisis típica de la célula tumoral. Entender en profundidad la remodelación metabólica que ocurre en los tumores requiere conocer las vías de señalización involucradas en este proceso.

En la célula tumoral el control de este balance incluye cambios en las mitocondrias, regulación de enzimas limitantes de la glicólisis, cambios del pH intracelular, efectos derivados de la hipoxia y la participación de oncogenes y genes supresores tumorales, que son a su vez fundamentales en la iniciación y progresión del cáncer [10,11].

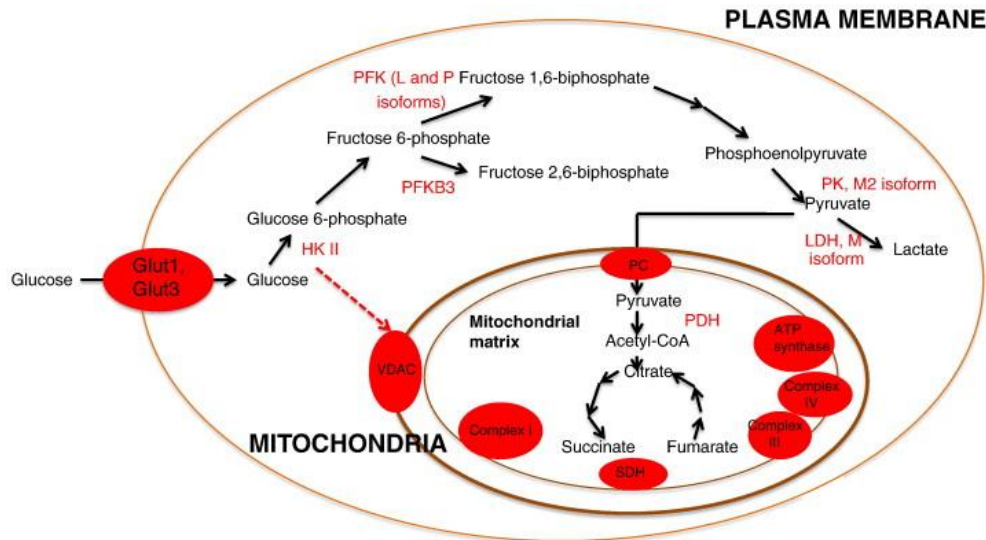


Fig. 2. Glicólisis en la célula tumoral [6].

El factor inducible de hipoxia (HIF-1) parece un elemento clave en esta regulación ya que incrementa la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, la síntesis de enzimas glicolíticas como las HK1/2, la PK1 o la isoforma M2 de la PK. Además aumenta la producción de lactato y su transporte al espacio extracelular por inducción de la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDH-A) y del transportador MCT4. La inactivación de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDH) –enzima responsable de la conversión de piruvato en acetil-CoA– por mediación de HIF-1, junto con este aumento de ROS y la disminución de la respiración celular, reforzarían la mayor dependencia en la glicólisis de estas células para la obtención de energía. Todas estas alteraciones conferirían una ventaja selectiva para la supervivencia y la proliferación tumoral. En la figura 3 [12] se muestran los diferentes pasos y enzimas que participan en la glicólisis mostrando las diferencias entre los fenotipos tumorales glicolítico y respiratorio.

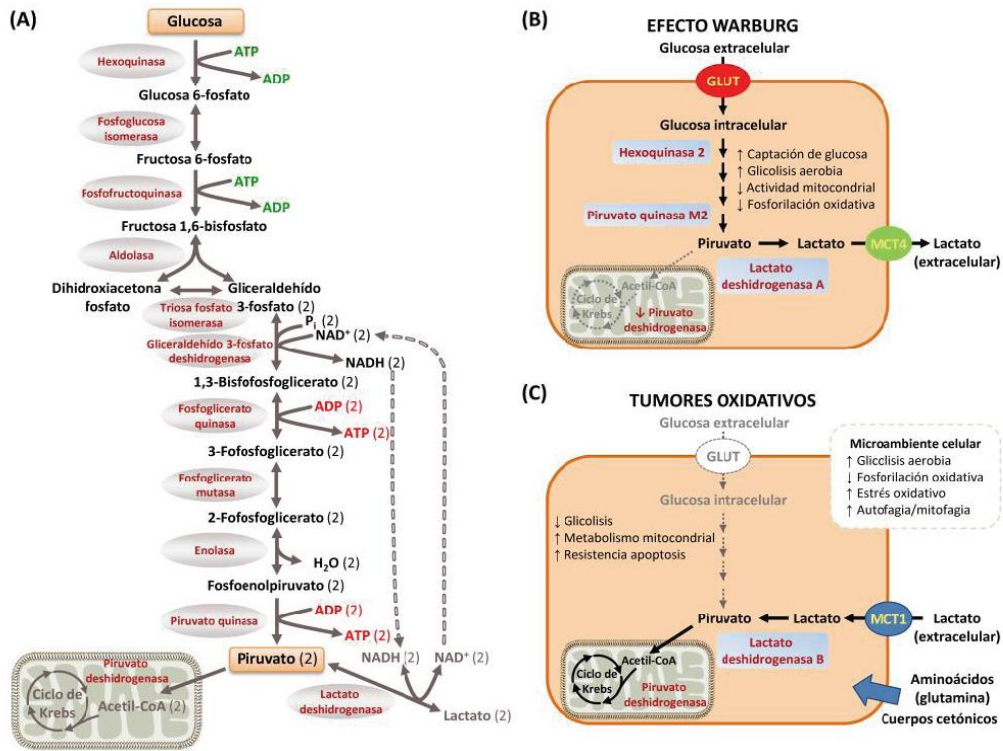


Fig. 3. Glicólisis mostrando destinos del piruvato (A), y fenotipos tumorales glicolítico (B) y respiratorio (C) [12].

Hay autores que conceden a la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) un papel fundamental en la regulación metabólica. Su activación inhibe múltiples procesos de síntesis celular consumidores de energía como la síntesis de ácidos grasos, el colesterol o las proteínas, lo que sucede en condiciones de privación nutricional o hipoxia, y por modificaciones postranscripcionales en relación con varios genes supresores tumorales [11]. En la figura 4 se muestran los factores de crecimiento y de regulación de la vía AMPK y su participación en la modulación de la glicólisis citoplásmica y la fosforilación oxidativa.

En los últimos 10 años se ha avanzado de una forma importante en el conocimiento del metabolismo energético de la célula tumoral, tanto por el número de cánceres estudiados, como por las investigaciones relacionadas con el papel de

las redes transcripcionales y la relación de la célula con el microambiente tumoral. Se ha clarificado el papel de las mutaciones en cMyc, Mycn, Kras y P53 y su impacto bioenergético en la célula y sus modificaciones en el transcurso del desarrollo tumoral [9-11].

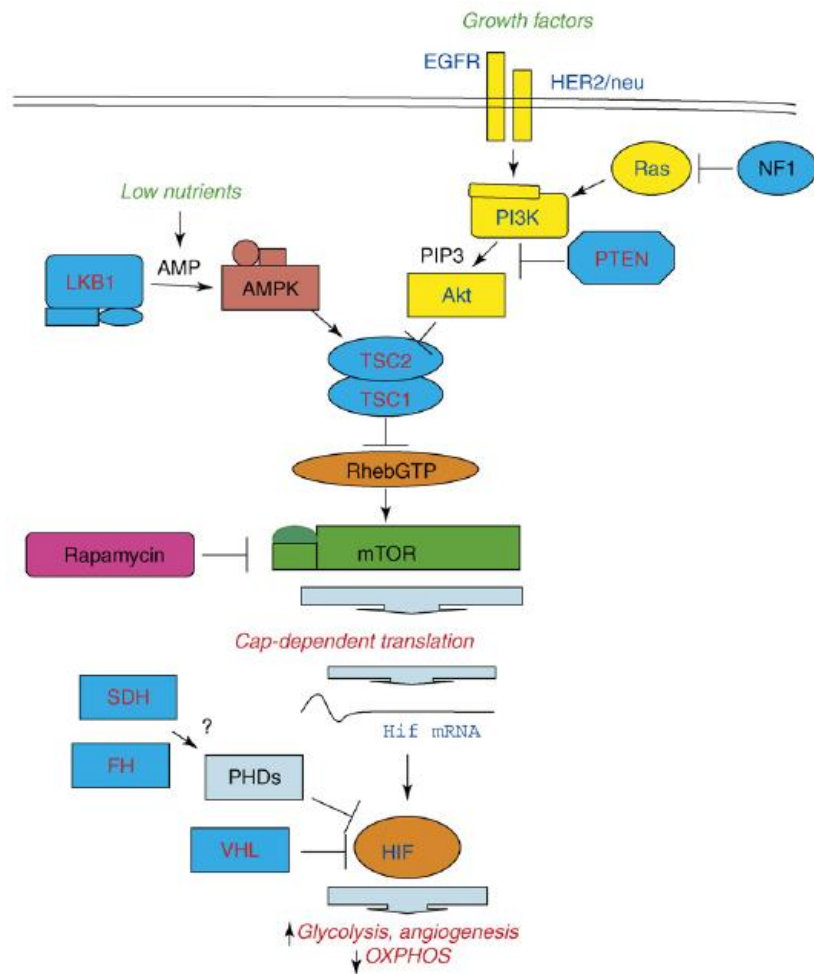


Fig. 4. Factores de crecimiento y de regulación de la vía AMPK que conducen a un aumento de expresión de HIF-1 [11].

El papel de mediadores de especies reactivas de oxígeno producidas en la respiración en la remodelación metabólica y en el desarrollo de metástasis también ha sido motivo de estudio recientemente. Estos avances se han trasladado ya a ensayos preclínicos en busca de dianas terapéuticas actuando sobre varias enzimas relevantes de la glicólisis como son la LDHA, la HK2, la fosfoglicerato mutasa 1

(PGAM1) –catalizadora del intercambio de 2/3-fosfoglicerato– o la ATP citrato liasa (ACLY) responsable de la síntesis en el citosol de acetil-CoA [9]. La influencia en la oncogénesis de metabolitos intermedios derivados del metabolismo energético celular alterado emerge así dando una nueva perspectiva sobre la regulación genética en cáncer, y ampliando el conocimiento del papel de la respiración en la biología tumoral.

Por otro lado en algunos tumores se ha encontrado un sinergismo o acoplamiento metabólico entre las células estromales normales y las tumorales, identificando este microambiente tumoral como un elemento clave para la progresión del cáncer. Así, los fibroblastos asociados al tumor son glicolíticos y proporcionan lactato, además de aminoácidos como glutamina y cuerpos cetónicos a las células tumorales oxidativas. Estas células son capaces de utilizar estos nutrientes como fuente de energía, gracias a su elevado metabolismo mitocondrial, la sobreexpresión de MCT1 y LDHB, y la inhibición de la glicólisis, o incorporarlos como precursores metabólicos necesarios para el desarrollo tumoral. Esta comunicación metabólica intercelular se ha vinculado directamente con la agresividad del cáncer [7,8]. En la figura 5 se muestra marcada en azul la glicólisis, que está aumentada al doble en los fibroblastos proliferantes.

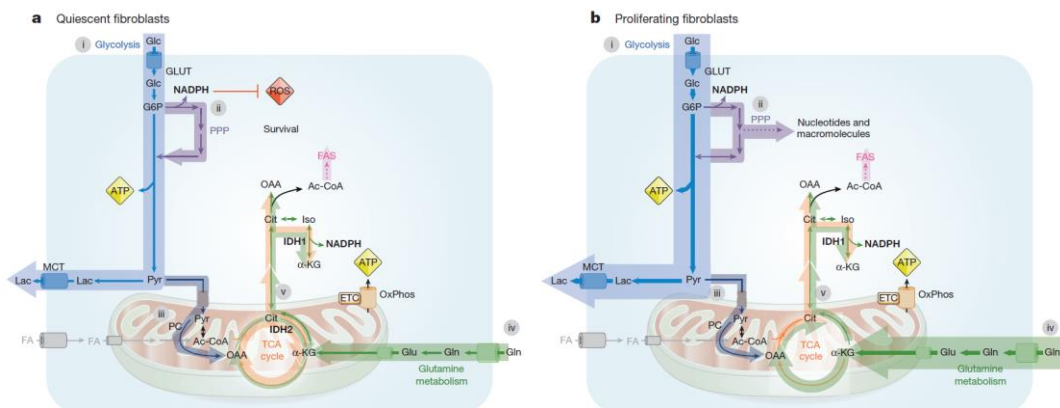


Fig. 5. Esquemas de las vías metabólicas presentes en los fibroblastos quiescentes (a) y en los activados respectivamente (b) [8].

Las interacciones metabólicas entre diferentes tipos de células cancerosas, y entre éstas y el estroma, complican el conocimiento del mecanismo bioenergético celular y hacen pensar en mecanismos compartidos y reversibles entre sí, más que en vías selectivas para obtención de energía.

Por todo lo expuesto anteriormente, las modificaciones del metabolismo energético son fundamentales en la transformación neoplásica permitiendo la modificación y/o reprogramación de la célula tumoral para favorecer su replicación. Por lo tanto, la profundización en el conocimiento de la glicólisis en cáncer y en su substrato genético, es de gran importancia por sus posibles implicaciones clínicas para los pacientes. La consideración de esta vía metabólica como una de las transformaciones biológicas clave para la supervivencia tumoral, ha conducido a varios grupos de investigación a explorarla como una nueva posible diana terapéutica en cáncer [5,9,13].

1.2 PET-CT Y CUANTIFICACIÓN

La tomografía por emisión de positrones (PET) es la forma más precisa de imagen médica basada en radiotrazadores para su utilización en humanos [14]. La producción de radioisótopos emisores de positrones como el ^{15}O , el ^{13}N , el ^{11}C o el ^{18}F , por parte de ciclotrones de uso médico, permite el marcaje de un sinnúmero de moléculas sin alterar su función biológica. Ésto permite analizar la fisiología y la bioquímica regional tisular, los efectos de los fármacos (farmacodinamia) y la farmacocinética de un órgano o territorio, convirtiendo al PET en una potente herramienta médica para la comprensión del funcionamiento normal y enfermo del sujeto y con relevantes repercusiones en terapia, tanto poblacional para el desarrollo de medicamentos, como de una forma individualizada en la práctica clínica habitual con pacientes. Entre estos radioisótopos, el ^{18}F es el de mayor interés en clínica por su mayor vida media (109.7 min), que hace factible la comercialización de los radiofármacos a puntos distantes del lugar de producción.

Casi 90 años de investigación y numerosas publicaciones científicas avalan el uso del PET/CT en oncología [15]. Sin embargo, hubo que esperar hasta finales de los años 70 (de cuando datan los primeros equipos disponibles comercialmente para su uso en oncología), para comenzar a medir la perfusión, el consumo de oxígeno y el metabolismo de la glucosa en un principio en tumores cerebrales [16-19]. A comienzos de 1980, Di Chiro y cols. [17] fueron los primeros en proponer el uso de la ^{18}F -Fluoro-2-desoxiglucosa (FDG) PET como una herramienta diagnóstica útil en tumores cerebrales y Alavi y cols. [20] establecieron su utilidad pronóstica en gliomas. En 2001, Gambhir y cols. publicaron un compendio de la indicaciones del PET FDG en oncología, cardiología y neurología, basados en una revisión sistemática de la literatura científica recogida entre 1986 y junio del 2000 [21]. Este documento fue remitido formalmente a la Agencia Americana de Financiación de la Salud Pública (HCFA) y sirvió para la inclusión por primera vez de esta modalidad diagnóstica en las prestaciones de un sistema nacional público de salud (*Medicare*).



Fig. 6. Imagen del tomógrafo PET/CT del Hospital Quironsalud Torre Vieja.

La FDG, análogo parcialmente metabolizable de la glucosa, es el radiofármaco más habitualmente utilizado en PET por su acumulación de forma selectiva en la mayoría de los tumores, ya que presentan un consumo energético

aumentado. Una vez que la FDG se inyecta al torrente sanguíneo se incorpora a la célula con idéntica ruta metabólica que la glucosa. En la figura 7 se muestra esquemáticamente las vías de metabolización y atrapamiento celular, por un lado de la glucosa y por otro de la FDG. Como hemos visto anteriormente, la célula tumoral puede utilizar de forma simultánea la glicólisis citoplásmica, la respiración mitocondrial y la vía del ácido láctico. Estos mecanismos permiten a la célula tumoral mantener un alto estado catabólico, necesario para su proliferación y supervivencia, y requieren un aumento del consumo de glucosa o sus análogos, como en este caso la FDG. Una vez que la FDG entra en la célula y se metaboliza por la HK queda atrapada intracelularmente, a diferencia de lo que ocurre con la glucosa que sigue avanzando en las sucesivas etapas de la glicólisis. La incorporación de la FDG se correlaciona por tanto con la expresión del GLUT y la actividad de la HK, así como de las múltiples enzimas que las regulan.

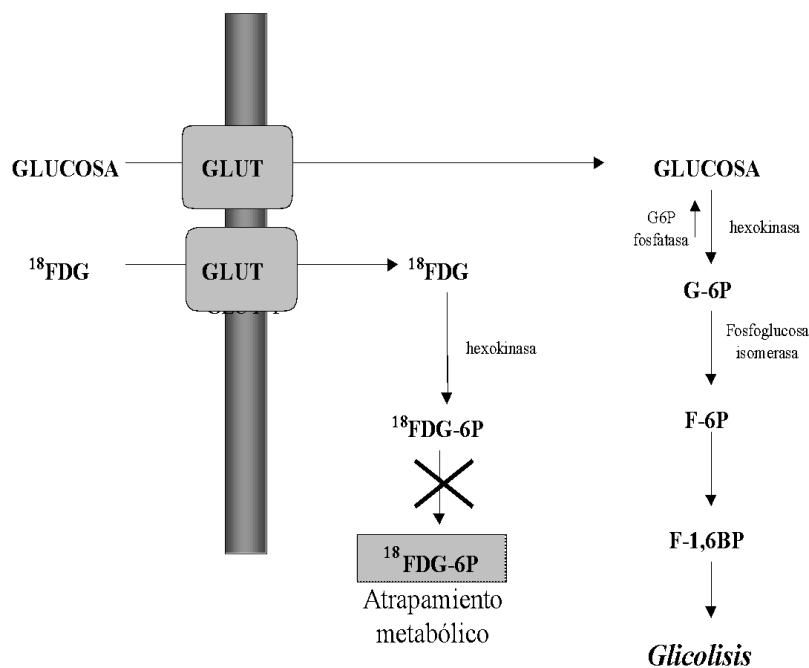


Fig. 7. Esquema del metabolismo intracelular de la FDG y la glucosa.

La sensibilidad del PET es tal que, tras inyectar de forma habitual aproximadamente 6 pmol de FDG, se pueden detectar acumulaciones intratumorales inferiores a 1 fmol/l [22]. Hay autores que han determinado,

mediante estudios *in vitro* en líneas celulares de gliomas, que el límite de detección del PET es de entre 10^5 - 10^6 células [23]. Estos datos muestran la exquisita sensibilidad de esta tecnología y corroboran su enorme potencial para detectar precozmente cáncer.

El interés clínico del PET/CT está bien establecido y su uso extendido en un gran número de aplicaciones en oncología como la diferenciación entre lesiones malignas y benignas, la búsqueda de un tumor primario desconocido, el estudio de extensión, la monitorización de la respuesta, la identificación de enfermedad residual o de una recaída precoz, la selección del lugar idóneo de biopsia o la planificación del campo de radioterapia [24-27]. Otras potenciales indicaciones en cáncer que suscitan un creciente interés son el *screening* en pacientes de riesgo y la monitorización precoz de la respuesta.



Fig. 8. FDG PET/CT: Imagen coronal de una paciente con cáncer de mama que muestra adenopatías patológicas axilares y mediastínicas.

Aunque la aplicación clínica del PET se centra actualmente en los estudios con FDG, es importante resaltar que la utilización de otros radiofármacos permite

estudiar muchos otros procesos biológicos relevantes en cáncer [22,28]. En la tabla I se muestra un listado de algunos de los procesos biológicos relevantes en cáncer que pueden estudiarse y cuantificarse con PET, y el radiofármaco utilizado para ello.

Para algunas indicaciones del PET, como son la monitorización de la respuesta al tratamiento o los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, el análisis de la imagen morfo-funcional no es suficiente y es fundamental la obtención de valores numéricos que reflejen la cantidad de radiofármaco PET distribuida en un volumen concreto. De esta forma, se pueden medir las variaciones de radiactividad en estudios realizados en diferentes momentos y comparar la evolución clínica del paciente y la efectividad de los tratamientos, u obtener modelos matemáticos que expliquen el comportamiento del trazador en su paso por distintos órganos.

Tabla I. Listado de algunos procesos biológicos estudiados en pacientes con cáncer y sus respectivos radiofármacos PET. Abreviaturas: ER: expresión del receptor, *Cu: cobre radiactivo.

Proceso Biológico	Radiofármaco PET
Metabolismo glucosa	[¹⁸ F]fluorodesoxiglucosa
Transporte/metabolismo aminoácidos	[¹¹ C]metionina, [¹¹ C]tirosina, [¹⁸ F]Fluoroetiltirosina y otros
Metabolismo lipídico	[¹¹ C]acetato, [¹¹ C]colina, [¹⁸ F]colina
Hipoxia	[¹⁸ F]FMISO, [*Cu]ATSM
Perfusión	[¹⁵ O]agua
Expresión transgénica (HSV tk1)	[¹⁸ F]FHBG, [¹²⁴ I]FIAU
ER Estrógeno	[¹⁸ F]FES
ER Andrógeno	[¹⁸ F]FDHT
ER Somatostatina	[¹⁸ F]octreótido [⁶⁸ Ga]análogos de octreótido
ER $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ Integrina	[¹⁸ F]RGD-péptidos, [*Cu]RGD-péptidos

La aparición de los PET/CT –equipos híbridos PET y TAC integrados en una misma máquina– además de aportar a los estudios funcionales información

anatómica fundamental para la interpretación, permiten implementar la corrección por la atenuación de los tejidos basada en la información proveniente del TAC, que es de alta calidad, y por tanto realizar la cuantificación de los procesos biológicos a estudio. Existen varias formas de cuantificación a través de la imagen PET, desde la menos precisa basada en la valoración subjetiva visual por comparación relativa de la captación en distintas áreas de interés, hasta la más compleja basada en modelos cinéticos compartimentales. Estos modelos más sofisticados de cuantificación, generalmente requieren determinaciones de actividad en muestras sanguíneas extraídas al paciente en distintos tiempos y adquisiciones seriadas dinámicas en una región concreta de interés, y se utilizan fundamentalmente en investigación básica y en estudios de farmacocinética y farmacodinámica en vivo. El más usado, tanto en clínica como en investigación aplicada, es el análisis semicuantitativo a través del SUV (*Standardized Uptake Value*) [29,30].

El SUV es un índice que refleja la concentración de actividad de radiofármaco en la zona de interés con el valor medio de concentración en el cuerpo, considerándolo como uniforme. Este índice se obtiene a partir de la calibración del tomógrafo PET mediante un estudio realizado a un cilindro relleno de una actividad de radioisótopo conocida en un volumen también conocido. El análisis de las imágenes obtenidas permite correlacionar la tasa de cuentas existente en cada pixel con la concentración conocida de radioisótopo y a partir de esa relación obtener un factor de calibración que determine la concentración de actividad por pixel.

Existen una gran cantidad de factores que afectan al cálculo del SUV, como son los aspectos metodológicos en relación con la preparación del estudio, biológicos del paciente, del equipo en cuanto a la adquisición, el procesado, la obtención de los datos, los parámetros utilizados en la reconstrucción, el tamaño de la región de interés (ROI), el factor de corrección de la emisión (ECF) y el algoritmo del SUV utilizado, entre otros [31,32]. En la tabla II se recogen los más relevantes.

Esta variabilidad ha llevado a muchos autores a cuestionarse la utilidad del SUV como sistema de cuantificación si no se controla correctamente y estandarizan las variables que lo condicionan [33].

Tabla II. Factores biológicos, técnicos y errores que afectan al SUV [30].

Factores Biológicos	Factores Técnicos	Errores
Glucemia	Parámetros de adquisición de la imagen	Calibración cruzada entre PET y activímetro
Periodo de captación	Parámetros de reconstrucción de la imagen	Actividades residuales de la dosis en sistema de administración
Movimiento	Estrategias de determinación del área de interés (ROI)	Fallos de sincronización entre los relojes del PET y activímetro
Comfort del paciente	Factores de normalización utilizados en el cálculo del SUV	Utilización errónea de la dosis/hora de administración por la dosis /hora decalibración
Inflamación	Uso de contrastes yodados durante el CT de corrección de atenuación	Extravasación parcial de la dosis

El SUV es un valor adimensional que se calcula a través de la siguiente expresión:

$$SUV = SF \frac{A}{(D/P)}, \text{ siendo:}$$

SF: Factor corrector aplicado a los valores SUV dependiente de cada equipo.

A: Actividad medida por unidad de volumen corregidos al tiempo de inicio de la adquisición.

D: Actividad inyectada corregida al tiempo de inicio de la adquisición.

P: Peso del paciente.

Generalmente este índice se normaliza al peso del paciente, considerando una distribución homogénea teórica del radiofármaco. Pero como la distribución de la FDG en el organismo no es homogénea –por ejemplo se detecta mayor captación en tejido muscular que en el tejido graso– se han propuesto otro tipo de normalizaciones aplicables sobre todo a niños y a personas de extrema delgadez u

obesidad, como son la normalización por la masa magra del cuerpo sin grasa (*Lean Body Mass*, SUV_{LBM}) o por la superficie corporal (*Body Surface Area*, SUV_{BSA}) [34,35]. También se han propuesto otras correcciones del SUV como la corrección por la glucemia basal (SUV_{glu}).

Los valores de SUV más ampliamente utilizados son el SUV máximo (SUV_{max}), valor superior por pixel detectado en el ROI de interés, o el SUV medio (SUV_{medio}) resultado del valor medio de los píxeles del ROI, siguiendo las recomendaciones de la EORTC (*The European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) [36] y del Programa de Imagen del Cáncer del NCI (*National Cancer Institute*) en EEUU [37]. Sin embargo existen otros indicadores de SUV como son el SUV pico (SUV_{peak}) o el SUV total (SUV_{total}) recogidos en las guías de consenso que establecen los criterios de respuesta para tumores sólidos: RECIST y PERCIST [38,39] o el MTV (*Metabolic Tumor Volume*) y el TLG (*Total Lesion Glycolysis*) de creciente interés en la actualidad [40-43].

1.3 VALORACIÓN PRECOZ DE LA RESPUESTA EN ONCOLOGÍA

Actualmente existe un amplio arsenal de medicamentos en oncología. Por un lado están los medicamentos clásicos que pertenecen al grupo de los denominados citostáticos y por otro están los tratamientos inmunológicos y los fármacos diana dirigidos al bloqueo de una vía de señalización necesaria para la proliferación tumoral [44]. Este último subgrupo terapéutico lo constituyen medicamentos de nueva generación que tienen un elevado coste, por lo que encontrar un método eficaz de valoración de la respuesta precoz cobra mayor importancia si cabe en este grupo, ya que la futilidad terapéutica conlleva no sólo una toxicidad evitable para los pacientes, sino también importantes repercusiones económicas para los sistemas sanitarios.

En este escenario se constata que los criterios habituales de valoración de la respuesta por imagen anatómica en tumores sólidos (RECIST) tienen importantes limitaciones. Por un lado, es bien conocido que el cambio del tamaño tumoral es un evento tardío de forma general en la respuesta terapéutica [45], así como la dificultad para valorar la respuesta en determinadas localizaciones como el hueso o la médula ósea mediante TAC. Este hecho es aún más importante en el grupo terapéutico de medicamentos diana en el que su efecto es básicamente citostático,

y por tanto la eficacia terapéutica puede no ir necesariamente seguida de una disminución de tamaño por apoptosis celular. Esto redundaría en la importancia de la identificación de un método eficaz y precoz de valoración de la respuesta [46-48].

Otra limitación a la hora de aplicar los criterios RECIST ha sido la variabilidad observada en la obtención de la medida con TAC. Erasmus y cols. [49] encontraron que las diferencias del tamaño de las lesiones por TAC realizadas por dos expertos podían clasificar erróneamente a los pacientes como progresión en el 29.8% de los casos o como respuesta parcial en el 13.8%. Además las medidas repetidas –variación interobservador– presentaban una variabilidad significativa, con un potencial de clasificación errónea del 9.5% para determinar la progresión y del 3% en la respuesta parcial. Esto podría explicarse por la dificultad en la definición del margen de las lesiones, sobre todo en aquellas más irregulares o de contornos mal definidos, que dificultan su valoración dimensional. Sin embargo, los coeficientes de reproducibilidad reportados para el SUV, fueron más favorables (10.0-11.9%) [50] superando incluso a los métodos automáticos de determinación de volumen por CT (20.8%) [51] o en RMN dinámica (26.1%) [52]. En la tabla III se muestran los resultados en cuanto a reproducibilidad del SUV recogida en la literatura y re-analizada mediante el cálculo de un coeficiente de variación inferido para su comparabilidad (wCV).

Tabla III. Reproducibilidad del SUV recogida en la literatura.

Publicación	Tipo de SUV	Reproducibilidad	wCV
Minn 1995	SUVmed	10%	8.86%
Weber 1999	SUVmed	9.1%	6.43%
Kamibayashi 2008	SUVmax	16.1%	14.27%
Nakamoto 2002	SUVmax	11.3%	10.01%
Krak 2005	SUVmax	13%	11.52%
Velasquez 2009	SUVmax	11.9%	11.9%
Hatt 2010	SUVmax	16.7%	11.81%

El PET/CT se plantea en este escenario como una alternativa de gran interés a los métodos de imagen convencionales para realizar este tipo de valoración

precoz, habiendo demostrado su capacidad para predecir la respuesta tumoral incluso tras una dosis única de tratamiento [53].

Sin embargo, el PET/CT con FDG como biomarcador de imagen de elección tiene también sus limitaciones y hay aspectos aún por concretar para considerarlo la técnica de imagen de elección en la valoración de respuesta. Está bien contrastado que la ausencia de captación implica la muerte celular y por tanto la respuesta completa, y que la aparición de nuevas lesiones hipermetabólicas es criterio cierto de progresión y esto ha conducido a su implementación en la práctica clínica [27,37,39,54]. No obstante, no se han podido establecer unos criterios de consenso homologables entre los distintos centros sobre los aspectos metodológicos de la medición o los criterios respuesta metabólica en clínica por reducción porcentual del SUV. Es conocido que se reportan diferentes porcentajes de reducción del SUV como criterio de respuesta, y cómo este porcentaje es marcadamente diferente en función del tipo tumoral, de las pautas terapéuticas, del ciclo de tratamiento o del tiempo transcurrido tras él para la valoración. En las figuras 9 y 10 [36] se realizan sendas representaciones gráficas que muestran esta variabilidad a partir de diferentes datos de respuesta recogidos en la literatura. Una definición de respuesta metabólica consensuada basándose en porcentajes de reducción del SUV no está por lo tanto exenta de controversias o limitaciones: por ejemplo la EORTC ha propuesto como criterio de respuesta reducción de al menos el 25% del SUV, mientras que la UPICT (*The Uniform Protocols for Imaging in Oncology Clinical Trials*, auspiciada por el *National Institute of Health*) propone una reducción del 30%. Como se ha comentado las diferencias más relevantes obedecen a las variaciones en la reducción porcentual de SUV observada dependiendo del tiempo transcurrido del tratamiento. Wieder y cols. [55] por ejemplo analizaron la respuesta en 27 pacientes con cáncer de esófago a las 2 y 4 semanas del tratamiento siguiendo los criterios de la EORTC, y encontraron correlación con la respuesta histológica y el pronóstico tan solo en el primer grupo. Además, se conoce que los cambios inflamatorios que siguen a la radioterapia pueden persistir más de seis meses después del tratamiento, provocando falsos positivos con PET/CT FDG.

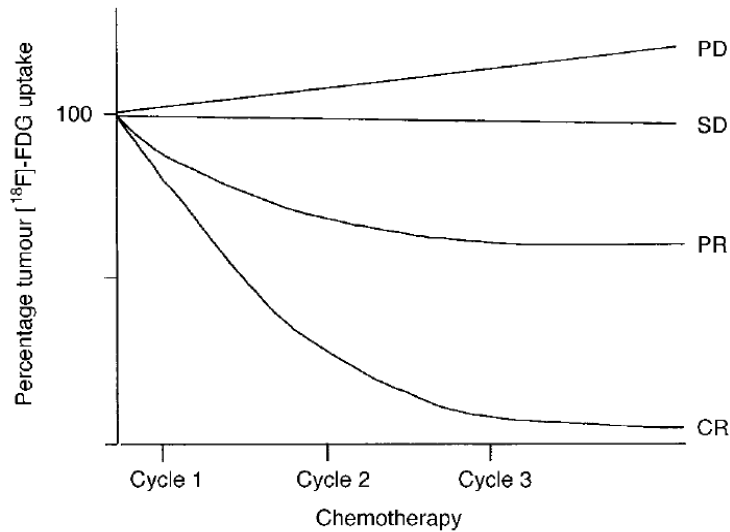


Fig. 9. Representación del porcentaje de reducción del SUV en función de la evolución clínica y el tiempo transcurrido desde cada ciclo de tratamiento. PD: progresión de la enfermedad; SD: enfermedad estable; PR: respuesta parcial; CR: respuesta completa [36].

Existen diferencias importantes a la hora de valorar el papel de los biomarcadores de imagen para determinar la respuesta precoz según se trate de un ensayo clínico de un medicamento en fase I o II —cuyo propósito es determinar si hay algún efecto o no— o de un ensayo en fase III o en la práctica clínica habitual —en donde se requiere cuantificar el grado de respuesta y valorar pronóstico o impacto en supervivencia—. Sin embargo, siguen publicándose avances en la estandarización y en la homologación de criterios clínicos y de investigación [56-60] y hay una gran cantidad de estudios en marcha y revisiones, recogidos en las revistas clínicas de mayor impacto en cada especialidad, que establecen el papel del PET/CT FDG en cada una de las patologías —linfomas, cáncer de esófago, pulmón o mama, entre los más señalados— contemplando los diferentes escenarios clínicos y que permitirían la generalización de su utilización en clínica e investigación [54,55,61-76].

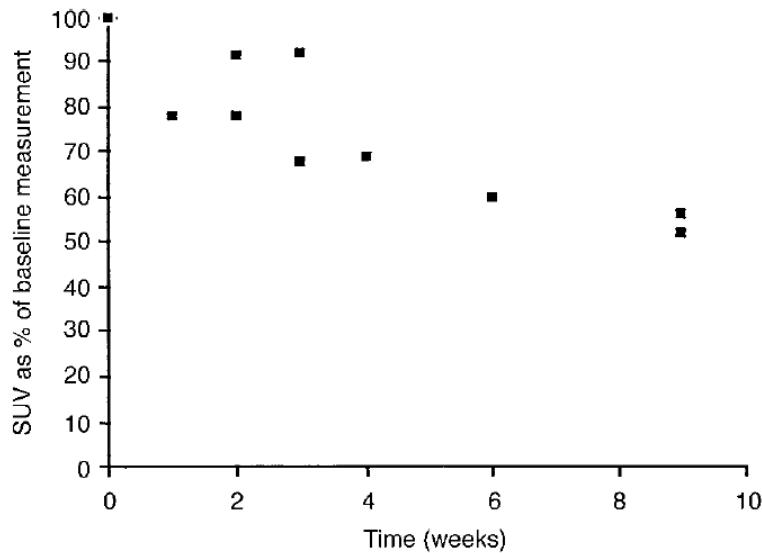


Fig. 10. Porcentajes de reducción del SUV en pacientes en respuesta [36].

También se ha encontrado que la precisión del PET/CT no es igual en todas las situaciones clínico-patológicas y que existen diferencias en función del tamaño de las lesiones en estudio, de la histología del tumor o de las combinaciones de tratamiento utilizadas [36]. La robustez del SUV como predictor de respuesta depende también del grado de avidéz por la FDG del tumor [56,77] y por tanto podría ser que no todos los tumores o situaciones clínicas fueran subsidiarios a priori de una valoración coste-eficiente con PET/CT. Las limitaciones mencionadas no han impedido que el PET/CT con FDG se establezca cada vez con más fuerza como el biomarcador de imagen de elección por su reproducibilidad, capacidad de identificar respondedores de forma muy precoz y con un favorable balance coste/beneficio frente al resto de técnicas de imagen médica [78-82], siendo adoptado ya como un estándar en algunos sistemas nacionales de salud para determinadas indicaciones [83,84].

A pesar de la gran expansión del uso del PET/CT, los mecanismos celulares y moleculares que determinan la captación de la FDG por parte de los tumores siguen siendo poco conocidos. En contraste con la amplia y bien documentada bibliografía en relación con su papel clínico, la heterogeneidad en la captación de

FDG por los tumores no ha sido tan ampliamente estudiada. Generalmente se ha buscado el paralelismo entre una mayor captación y el grado de dediferenciación histológico [85-87] o las elevadas tasas de proliferación [85,88], si bien la correlación encontrada entre estos parámetros ha sido más bien modesta. Posteriormente, los estudios se han encaminado a estudiar los genes involucrados en el transporte y metabolismo de la glucosa, encontrándose asociación con significación estadística entre la intensidad de captación con FDG y la expresión de HK1-2, PK1-2, GLUT 1-2-3 y LDHA, entre otros [85,88-114]. Más recientes son los estudios que buscan la correlación entre la captación de FDG y la activación de vías oncogénicas como KRAS, p53-, cMyc, AMPK/mTOR, PI3K-Akt, ERB2-neu o del HIF1 α , mostrando diferencias significativas en la captación de FDG en función de la vía que se encuentre activada e independientemente del grado de diferenciación [103-106]. Sin embargo, la mayoría de éstos son estudios preclínicos realizados sobre líneas celulares tumorales o en muestras reducidas de pacientes de un solo tipo histológico tumoral y estableciendo a priori un número seleccionado de genes a analizar [85-114]. Estos estudios parciales aportan datos no concluyentes e incluso dispares en cuanto a la identificación de marcadores consistentes en la captación de FDG [85,88,114], probablemente debido a la dificultad de generalizar los hallazgos encontrados con estos abordajes parciales a la gran heterogeneidad molecular observada en los tumores humanos.

En este sentido —tal y como se propone en este trabajo— es pertinente ahondar en los mecanismos genéticos moleculares que condicionan la captación de FDG, sobre todo cuando se pretende utilizar el PET/CT como biomarcador precoz de respuesta, terreno éste aún controvertido y que presenta retos importantes por resolver. Para ello se propone el uso de microarrays de expresión génica (MAGE) valorando un elevado número de genes no preseleccionados, realizados en una representativa muestra de pacientes metastásicos de diverso origen histológico, con la intención de profundizar en el conocimiento de los factores que más significativamente se correlacionan con la captación de FDG e intentar poder predecir el perfil de aquellos pacientes que más pueden beneficiarse a priori de esta tecnología para la determinación precoz de la respuesta.

1.4 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

El cáncer es una enfermedad genética, aunque éste es un concepto relativamente nuevo. Desde la década de 1950, con el descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick [115], junto con la evidencia de que el cáncer se puede heredar y la identificación de oncogenes (gen del sarcoma de Rous en los años 70) [116] y de genes supresores del cáncer (como el del retinoblastoma en los años 80) [117], se ha profundizado en las causas genéticas que subyacen al complejo fenómeno del cáncer.

El hecho de la expansión clonal de la célula tumoral se acompaña de mutaciones que capacitan a las subsiguientes poblaciones de capacidad invasiva y potencial metastatizador. La identificación de todos los factores involucrados en el desarrollo del cáncer permite no sólo una mayor comprensión de la enfermedad (o mejor dicho, de este conjunto de enfermedades) sino que tiene implicaciones en la identificación de marcadores diagnósticos y nuevas dianas terapéuticas —la mayoría de los tumores malignos del adulto como el cáncer de pulmón, el colorrectal o el cáncer de mama, entre otros, presentan múltiples alteraciones genómicas con implicaciones terapéuticas—. Un hecho crucial en el camino de conocimiento fue la secuenciación inicial y publicación del genoma humano completo en el 2001 [118], con la identificación de unos 25.000 genes en su última estimación [119].

Los micoarrays de expresión génica permiten, mediante la utilización de los avances bioinformáticos, profundizar en el conocimiento de múltiples procesos biológicos y se vienen utilizando ampliamente en el conocimiento del cáncer. La premisa sobre la que se basa esta tecnología de los microarrays consiste en miles de fragmentos de DNA (llamadas sondas) representativas de varios genes, ancladas sobre la superficie de un material inerte. Su funcionamiento consiste básicamente en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana (un RNA mensajero obtenido experimentalmente y marcado mediante fluorescencia) a través de un análisis cuantitativo de la imagen de fluorescencia obtenida, lo cual indica el nivel de expresión de RNA mensajero y por extensión de un gen determinado. En la figura 11 se recoge una representación típica de los resultados de un MAGE.

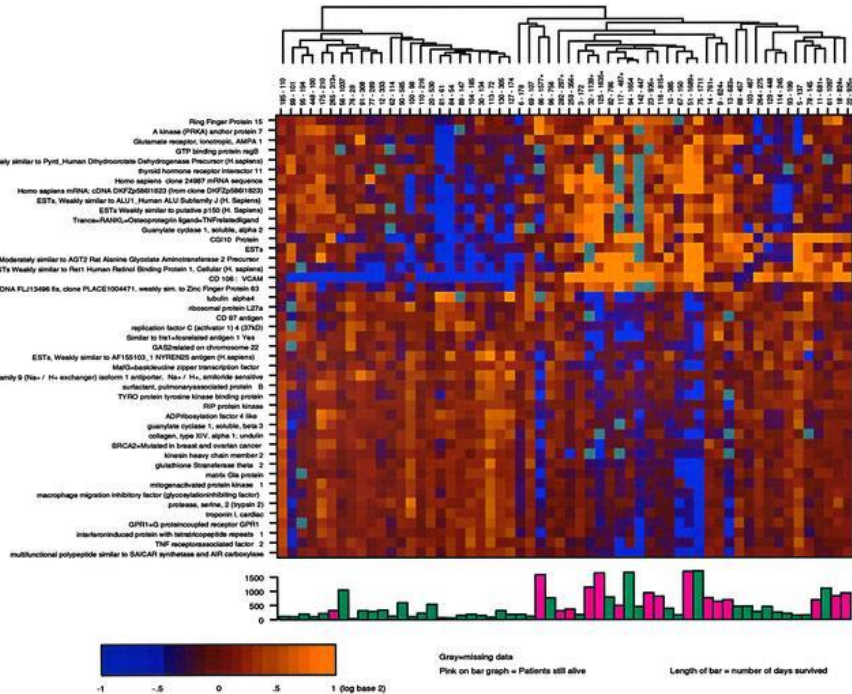


Fig. 11. Representación típica de los resultados de un MAGE. Matriz de 45 genes asociados con la supervivencia en cáncer renal [120].

La tecnología de microarrays tiene importantes aplicaciones en oncología. Permite por ejemplo la comparación entre la expresión genética de un tejido tumoral y su tejido homólogo sano, entre diferentes tipos histológicos entre sí o entre tumores de un mismo tipo pero de distintos grados de agresividad. La cuantificación relativa de los genes, expresada en un determinado número de veces en las que se dobla la expresión respecto al patrón que se establezca en cada caso, proporciona una comparativa que permite la identificación de subgrupos histopatológicos relevantes por su diferente comportamiento en cuanto a su evolución y/o pronóstico, algunos de ellos ya disponibles comercialmente como Oncotype DX, MammaPrint o Mammostrat. Además, puede tener implicaciones terapéuticas directas ya que permite la identificación de dianas para los medicamentos de nueva generación, o bien a la identificación de genes de sensibilidad o resistencia para los citostáticos convencionales. Cuando se dirige así la selección de los fármacos con mayor probabilidad de eficacia, se han reportado excelentes resultados en tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión en

pacientes metastásicos resistentes a múltiples combinaciones previamente ensayadas [121,122]. La utilización de los microarrays en clínica está implantada en la caracterización genética de tumores tan frecuentes como el cáncer de próstata [123,124], ovario [125], riñón [120], mama [126,127] y pulmón [128,129] entre otras neoplasias [130-132].

En este trabajo se han reanalizado los microarrays —realizados con fines asistenciales en pacientes metastásicos para diseñar un esquema personalizado de tratamiento en función de presencia o ausencia de genes de sensibilidad o resistencia a los fármacos habituales— con la intención de profundizar en el conocimiento de aquellos que condicionan la captación de FDG. De esta forma se ha pretendido identificar aquellos genes expresados por el tumor con mayor correlación positiva con la intensidad de radiactividad retenida por la metástasis, obtenida en el estudio PET/CT. Esta información permitirá profundizar en el conocimiento del metabolismo glicolítico en cáncer, en la proliferación y diseminación tumoral. Se ha pretendido confeccionar una firma genómica que permita predecir la actividad metabólica de los tumores y determinar cuáles puedan beneficiarse de esta tecnología para una valoración precoz de la respuesta. En un futuro próximo esta información podría ser relevante para la identificación y selección de medicamentos dirigidos a nuevas dianas terapéuticas relacionadas con el metabolismo de la glucosa, actualmente en desarrollo [108,133,134].

2. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Dada la relación previamente establecida por otros entre la captación de FDG y determinados procesos metabólicos como la glicólisis y la respiración mitocondrial (presentes de manera universal en múltiples tumores), así como el reciente reconocimiento del metabolismo energético como una de las tres nuevas señas de identidad de las capacidades biológicas específicas en el desarrollo multifactorial del cáncer humano (*Hallmarks of Cancer I y II*), cabe pensar que es posible elaborar una firma genómica que permita predecir la intensidad de captación del FDG en tumores metastásicos mediante la identificación de los genes comunes que correlacionan mejor con dicha captación en un grupo heterogéneo de tumores.

2.2 JUSTIFICACIÓN

La principal aportación original de este trabajo se basa en la utilización de un microarray de expresión que cubre la totalidad del genoma humano para estudiar la captación de FDG en PET/CT, y correlacionar de manera no sesgada los genes más representativos relacionados con este proceso mediante la elaboración de una firma genómica que capture los procesos biológicos subyacentes a múltiples tumores humanos, adquiriendo así una nueva perspectiva y un mejor entendimiento de la captación de FDG y sus consecuencias en tumores malignos. Como se ha expuesto en la introducción, en la literatura la mayoría de los estudios realizados se han centrado en la valoración de unos pocos genes, a priori preseleccionados como más relevantes, asociados con la metabolización y el transporte de la glucosa, con la proliferación y la agresividad tumoral o con vías preferentes oncogénicas. En estos trabajos se ha tratado de predecir la expresión de dichos genes en base a la captación de FDG medida en PET/CT. Sin embargo, en este trabajo se han invertido los términos y, de manera novedosa, se han investigado aquellos genes que condicionan la captación de FDG en diversos

tumores, así como los procesos biológicos subyacentes que muestran una sobrerrepresentación estadística derivada de la expresión de estos genes, para tratar de entender mejor las consecuencias moleculares de la captación de FDG en pacientes con cáncer metastásico.

Además, en la literatura estos estudios se han realizado fundamentalmente sobre líneas celulares implantadas en animales de experimentación o bien sobre muestras pequeñas de pacientes de una variedad histológica en concreto. En este trabajo sin embargo, se han analizado pacientes con metástasis de diferentes orígenes histológicos, representativos de los tumores más frecuentes en la población, haciendo por lo tanto más generalizables los hallazgos. Determinar los procesos biológicos más relevantes involucrados en la captación de FDG y su correlación con diferentes parámetros de cuantificación, contribuiría a establecer los fundamentos metabólicos del PET/CT como biomarcador precoz en pacientes con metástasis.

Los recientes hallazgos en relación con el diseño de fármacos dirigidos a bloquear distintas vías energéticas selectivas de la célula tumoral ponen aún más de manifiesto el interés en la profundización del conocimiento de los procesos de obtención de energía por la célula tumoral, y sus bases genéticas y moleculares.

2.3 OBJETIVOS

Por tanto, en base a todo lo anteriormente expuesto, y con el fin de profundizar en la utilidad del PET/CT con FDG para determinar la respuesta precoz en pacientes oncológicos, en la presente memoria se han planteado los siguientes objetivos principales:

1.- Identificar aquellos genes expresados por el tumor con mayor correlación con la intensidad de radiactividad retenida por la metástasis obtenida en el estudio PET/CT FDG, mediante el uso de un amplio panel de MAGE realizados en una muestra representativa de pacientes con metástasis.

2.- Identificar los procesos biológicos más sobrerrepresentados en los genes seleccionados, que permitan entender las consecuencias patológicas derivadas de la captación de FDG, así como su posible utilidad como biomarcador precoz de respuesta y/o en terapéutica.

3.- Confeccionar con dichos genes una firma genómica que permita predecir la actividad metabólica de los tumores y determinar cuáles pueden beneficiarse de esta tecnología PET/CT para una valoración precoz de la respuesta.

Adicionalmente se ha planteado como objetivo secundario analizar los distintos parámetros de cuantificación de la imagen PET para establecer de forma retrospectiva aquellos biomarcadores de cuantificación más relevantes para determinar la respuesta precoz.

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES

En este trabajo se han incluido todos los pacientes con tumores metastásicos a los que se les había realizado un PET/CT con FDG basal para la valoración posterior de la respuesta, y a su vez un MAGE para seleccionar el mejor tratamiento según el perfil de sensibilidad o resistencia a fármacos expresado por su tumor. El microarray fue obtenido en la misma localización de metástasis en la que se determinó la captación de FDG. Se incluyeron todos los pacientes sin restricciones de sexo, edad, tipo de tumor o tratamientos previos. Los pacientes no habían recibido tratamiento quimioterápico en las tres semanas previas al estudio. Se obtuvieron los consentimientos informados para la obtención de la biopsia diagnóstica-terapéutica y la realización del PET/CT de los pacientes incluidos en este trabajo, así como la aprobación del Comité Ético del Hospital.

Se analizaron retrospectivamente aquellos pacientes a los que, entre julio de 2010 y julio de 2015, se les había realizado en nuestro centro un microarray y un PET/CT con FDG con un intervalo máximo de 8 semanas. Se excluyeron aquellos pacientes en los que no se pudo identificar por PET tumor activo. En aquellos pacientes en los que se disponía de varios estudios se seleccionó el primero de ellos para su inclusión en este trabajo.

Estos pacientes, que se usaron para la elaboración de un modelo predictivo de la captación de FDG a partir de sus perfiles genómicos obtenidos de los microarrays de expresión, constituyeron lo que se denominó *training set*. El *training set* también se ha utilizado para estimar la capacidad predictiva del modelo, ya que *a priori* se desconocía si se dispondría de un grupo de pacientes de validación independiente. Esta estimación se llevó a cabo mediante *10-fold cross-validation* repetida 5 veces, que permite también evaluar la eficiencia de dicho modelo -tal y como se describirá más adelante- y ha constituido el *cross-validation set*. Adicionalmente se incluyeron de forma prospectiva los pacientes realizados a partir de julio de 2015 en los que se llevó a cabo el mismo protocolo de PET/CT con FDG y un MAGE con un intervalo entre ambas máximo de 8 semanas. De éstos, un

paciente fue excluido por presentar valores de SUV muy por encima del rango superior de SUV presentes en el *training set* usados para la generación del modelo. Aunque en otro de los pacientes se observaron valores de SUV ligeramente inferiores al mínimo observado en el *training set*, se decidió no excluirlo del protocolo, aun siendo conscientes de las limitaciones que esto supondría para la predicción. Su inclusión suponía exponer al modelo a la predicción de un dato para el que no estaba preparado anteriormente, por exceder el rango de los empleados en el *training set*. Finalmente se utilizaron 13 pacientes independientes del *training set* para la validación externa del modelo predictivo. Esta muestra constituirá el *validation set*.

3.2 ESTUDIO PET-CT

Los estudios PET/CT se realizaron en el equipo Biograph 6 Hi-Rez (Siemens Medical Solutions) de la figura 6. Este equipo se verifica diariamente mediante el control de calidad establecido por el fabricante, que incluye ambos componentes, PET y CT. La estabilidad del activímetro utilizado para la medición de las dosis de FDG se controla también a diario, así como se vigila periódicamente la adecuada sincronización entre la hora del activímetro y la del ordenador utilizado para introducir los datos de los pacientes en las adquisiciones. También se realizó una validación cruzada entre el activímetro y el PET/CT.

Todos los pacientes ayunaron durante al menos las 6 horas previas al estudio y se monitorizó la glucemia previamente a la administración de la FDG. Se inyectó una dosis aproximada de 440 MBq (12 mCi) 90 minutos antes de la adquisición, asegurando que la administración de la misma fuera completa –inyección mediante una vía antecubital previamente comprobada y lavados mediante suero fisiológico de la vía y de la aguja de inyección–. Durante el tiempo de incorporación se administraron a los pacientes 500 ml de suero fisiológico endovenoso y una dosis de 0.20 mg/Kg de furosemida 40 minutos antes de la adquisición. Primeramente se realizó la adquisición del CT (Eff. 120 mAs *Care Dose*; 110 Kv, *slice* 5mm) con administración de contraste endovenoso (65 ml ULTRAVIST® a una velocidad de 1.6-1.8 ml/s y retardo mínimo de 50 s) y a continuación se realizó la adquisición del PET. Los estudios se extendieron desde la región infraorbitaria hasta el tercio superior del muslo, con un tiempo de adquisición de 3-4 minutos por BED, en

función de las dimensiones del paciente. En el procesado PET se aplicó una reconstrucción iterativa con corrección de atenuación (CA) y de *scatter* (*size*: 168; *Zoom*: 1; *Filtro FWHM*: 5.0 mm; *iteraciones*: 4; *subsets*: 8). Se realizaron reconstrucciones del CT de CA y para la imagen de fusión PET/CT. Este protocolo de PET/CT está en consonancia con las guías de procedimiento para imagen tumoral propuesto por la EANM versión 2.0 [26] y sigue las recomendaciones propuestas en relación al uso de contrastes yodados radiológicos para minimizar su posible interferencia en la cuantificación [135].

Las medidas de cuantificación de actividad se realizaron sobre la lesión referenciada para la toma de biopsia del microarray, utilizando las herramientas de *software* disponibles en la estación de post-proceso Leonardo (TRUE D Syngo MMWP 2009B). En la figura 12 se muestra un ejemplo del entorno de trabajo de nuestra estación de post-proceso. Se obtuvieron los siguientes valores: el SUV máximo (SUV_{max}), el SUV medio 35% (SUV_{med35}), el SUV_{med35} corregido por masa magra (SUL), el SUV_{med35} corregido por glucemia basal (SUV_{glu}), el MTV (*Metabolic Tumor Volume*), el TLG (*Total Lesion Glycolysis*) y el cociente actividad del tumor y actividad de fondo (T/N).



Fig. 12. Entorno de trabajo para cuantificación mediante la estación Leonardo (*Siemens Medical Solutions*).

Para la cuantificación se situaron VOIs (*volume of interest*) de isocontorno semi-automático con un punto de corte (*threshold*) que correspondía al 35% del SUV_{max} sobre la lesión de interés. Las ratio tumor/fondo se obtuvieron mediante ROIs (*region of interest*) cuyo diámetro correspondiese al 50% del diámetro máximo obtenido del VOI, centradas en la zona de mayor actividad de la lesión y estableciéndose un tamaño mínimo de 1.5 cm (3 veces superior al límite de resolución del equipo) para minimizar el impacto del efecto parcial de volumen. En 5 pacientes, debido a las reducidas dimensiones de la lesión, el diámetro del VIO fue de 1.5 cm. La actividad de fondo se obtuvo mediante la duplicación del ROI tumoral, situado en un corte central del volumen del órgano diana sano.

El SUV_{max} y el SUV_{med35} se determinaron mediante el *software* de postproceso de la estación de trabajo en el VOI de *threshold* 35% del SUV_{max} . Este punto de corte para calcular el volumen tumoral se determinó a partir de un trabajo previo realizado por nuestro grupo para la optimización de las herramientas de contorno en la planificación de radioterapia (Serna y cols., Congreso Conjunto de la Sociedad Española de Física Médica XVII y Protección Radiológica XII, Póster 212-15, junio de 2009), y que es consistente con los propuestos en la literatura [32,77,136-138]. En aquellos tumores con escasa relación señal/fondo este valor tuvo que aumentarse (n=7 *threshold* del 60% y n=1 del 85%) para que el VOI se circunscribiese correctamente a la lesión tumoral.

El valor del SUL se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$SUL = LBM \times SUV_{med35} / \text{peso del paciente (kg)}, \text{ donde}$$

LBM (*Lean Body Mass*) es el valor de masa magra en kg obtenido mediante las fórmulas propuestas por Janmahasatian y cols. [139]:

$$LBMH = 9270 \times \text{peso del paciente (kg)} / (6680 + 216 \times BMI)$$

$$LBMM = 9270 \times \text{peso del paciente (kg)} / (8780 + 244 \times BMI), \text{ donde}$$

LBMH y LBMM son los valores de LMB para hombres y mujeres respectivamente y BMI el índice de masa corporal: peso/ altura² (kg / m²).

El SUV_{glu} se obtuvo aplicando la fórmula siguiente [140]:

$$SUV_{glu} = (SUV_{med35} \times \text{glucemia basal}) / 100 \text{ mg/dL}$$

El MTV se determinó por volumen tumoral en cm³ contenido en el VOI35%, y el TLG como el resultado del producto del SUV_{med35} y el MTV, según se recoge en la guía de FDG PET/CT de la EANM versión 2.0 [26].

3.3 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.3.1 Obtención de las muestras

El procedimiento de obtención y análisis de los microarrays fue el seguido habitualmente en nuestro centro y que está recogido en la publicación de Rebollo y cols. [122]. Las muestras de biopsia se obtuvieron de la lesión metastásica más accesible, bien mediante cirugía abierta o por punción guiada por imagen con aguja gruesa (14G/18G) con la extracción de 3 ó 4 cilindros. En los primeros 15 minutos las muestras fueron congeladas en OCT™ hasta su procesado, y una sección representativa teñida con hematoxilina-eosina fue evaluada por un patólogo para determinar su idoneidad. Se requirió un mínimo del 30% de presencia de tumor viable antes de proceder a la extracción del RNA. En nuestro estudio la presencia de tumor viable ≥ 50% se obtuvo en más del 90% de los casos.

3.3.2 Diseño e interpretación

Se extrajo de cada muestra RNA total mediante columnas de QIAGEN RNA *easy* y la cantidad total fue medida con un espectrofotómetro (*Nanodrop ND-1000*). Una vez extraído el RNA total, se determinó su calidad mediante el *Agilent 2100 Bioanalyzer* ilustrado en la figura 13 y se obtuvo el ratio 28S/18S y/o el RIN (*RNA Integrity Number*) de cada muestra.

Se utilizó un procedimiento de doble color en la hibridación. Se marcaron ~250 ng de RNA total extraído de la muestra tumoral del paciente con fluorocromo Cy5 utilizando el kit de marcaje *QuickAmp* y el kit de hibridación ambos de *Agilent Technologies*, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

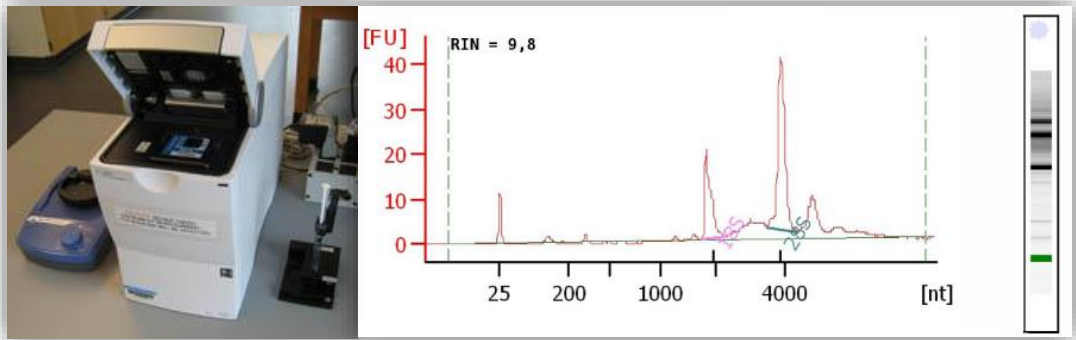


Fig. 13. *Agilent 2100 Bioanalyzer*: equipo y ejemplo de datos obtenidos.

Del mismo modo se marcaron ~250 ng de un RNA control obtenido comercialmente correspondiente a tejido normal del mismo órgano de procedencia del tumor de origen del paciente (*First Choice® Human Total RNA Survey Panel, Ambion*) con fluorocromo Cy3. Ambos RNAs así marcados, se hibridaron a 65°C durante 17 horas en un *Agilent Whole Human Genome microarray (4x44K)*, que contiene 41.000 sondas únicas, posteriormente se escanearon en un *Agilent G2505B Microarray Scanner*, ilustrado en la figura 14.



Fig. 14. *Agilent G2505B Microarray Scanner*.

Los datos procesados se obtuvieron mediante el *Agilent Feature Extraccion Software* que establece hasta 12 métricas de control de calidad, en términos de aceptabilidad de intensidad respecto del fondo en ambos canales, rojo y verde, y reflejando los valores de expresión de los genes incluidos en el microarray para cada muestra. Sólo los microarrays con un control de calidad en rangos aceptables fueron incluidos en este estudio.

Para comprobar la reproducibilidad intra-array se evaluaron las medianas de los coeficientes de variación (CV) de los valores de intensidad de las sondas de control repartidas por el microarray (264 sondas replicadas 9 veces, es decir un total de 2376 sondas). Todos los microarrays tuvieron una mediana del CV cercana o inferior al 1% (tal como se mide con el *software Agi 4x44 Preprocess* del proyecto Bioconductor) mostrando su elevada reproducibilidad.

La inclusión de un RNA procedente del tejido normal como referencia se realizó para poder comparar los niveles de expresión de los distintos genes encontrados en la muestra tumoral con los presentes en el tejido normal, pudiéndose identificar así los genes que se expresan de manera preferencial en el tumor, con el fin de identificar dianas terapéuticas. En este estudio, en el que se reevaluaron los microarrays indicados con finalidades clínicas terapéuticas, la información obtenida del RNA control se utilizó únicamente para la corrección de los datos puros (*Raw Data*) del RNA de los pacientes. Sólo se utilizaron para su correlación con el valor de captación de FDG los valores procesados del RNA provenientes de las muestras de los pacientes. Los valores de Cy5 procesados incluyeron la corrección del *dye bias* –corrección de la desviación de la medida atribuible a la tinción y no a la expresión en un array determinado– mediante una normalización lineal y *lowess*. En la figura 15 se recoge esquemáticamente la secuencia de obtención de los datos del microarray.

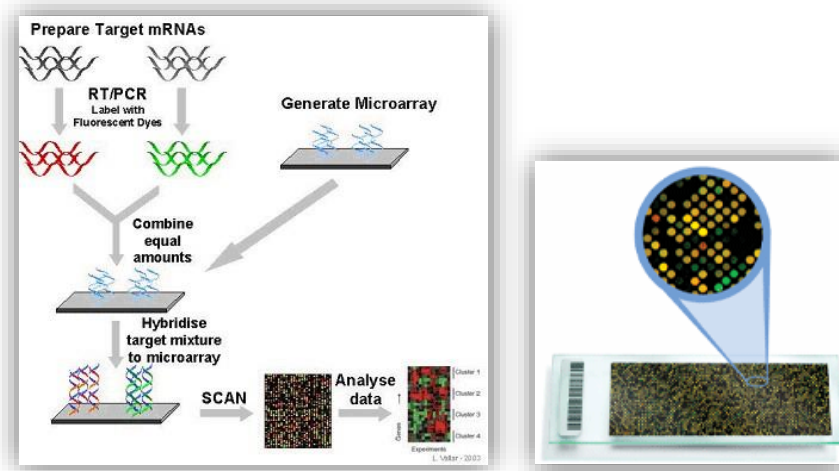


Fig. 15. Secuencia de marcate, hibridación y obtención de datos del microarray.

3.3.3 Análisis estadístico para la elaboración de un modelo predictivo de captación FDG a partir de datos de expresión de microarrays

3.3.3.1 Manejo y preparación preliminar de los datos de expresión de los microarrays

Antes de la modelización de los datos de expresión de los microarrays fue necesario realizar el pre-procesamiento de los mismos como preparación para los análisis posteriores. El pre-procesamiento consistió en: 1) corrección del fondo usando el método *normexp*, con un *offset*= 50,2) normalización entre arrays mediante el método *quantile* de los datos de expresión Cy5 corregidos para eliminar *dye bias*, 3) transformación logarítmica en base 2 y 4) realización de la mediana de la intensidad de las sondas idénticas en cada array para obtener un único valor de éstas, de manera que cada array se redujo a los valores de expresión de 41000 sondas diferentes y únicas. Todo ello se efectuó usando el entorno estadístico R versión 3.2.5 (<https://cran.r-project.org/>) y el paquete *limma* del proyecto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>).

Dado que los resultados de expresión pre-procesados incluyeron sondas que no se expresaban, o que apenas mostraban variación entre las distintas muestras del estudio, se procedió a filtrar los datos de expresión para eliminarlas ya que no aportaban información relevante alguna en la elaboración posterior del modelo.

Para este cometido se utilizó el paquete estadístico *genefilter* del proyecto Bioconductor, eliminando todas aquellas sondas con un rango inter-quantil (IQR) ≤ 0.5 . Tras el filtrado quedaron disponibles 22814 sondas por array.

3.3.3.2 Selección del valor representativo de captación de FDG a predecir

Entre los distintos parámetros de cuantificación de FDG descritos en el apartado anterior, el estudio descriptivo estadístico de estos valores en nuestra serie de pacientes mostró que los datos de SUV_{max} , SUV_{med35} y SUV_{glu} presentaban cierta linealidad y una distribución próxima a la normal tal como lo reflejaron los tests de normalidad (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov) y los QQ-Plots realizados. Sin embargo, el resto de parámetros (SUL, MTV, T/N y TLG) no presentaban linealidad y tampoco se ajustaban a una distribución normal. Dado que se consideró conveniente que los datos de captación de FDG a predecir presentaran las características mencionadas (linealidad y una distribución normal), ya que algunos métodos predictivos lineales –como por ejemplo aquellos que usan componentes principales– podrían ajustarse mejor a este tipo de datos, se prefirió el uso del SUV_{max} , del SUV_{med35} o del SUV_{glu} como variables dependientes continuas (las respuestas). Además se observó una alta correlación entre el SUV_{med35} y el resto de los parámetros de cuantificación estudiados, siendo el coeficiente de correlación rho según el método de Pearson (CP) en todos los casos estadísticamente significativo. Sin embargo, el CP más elevado se encontró entre el SUV_{max} y SUV_{med35} (CP 0.976, $p < 0.001$).

Ante la equivalencia de respuesta encontrada entre ambos valores SUV y la redundancia de datos que supondría incluir ambos, se decidió usar únicamente uno de ellos. En este caso se escogió el uso del SUV_{med35} como variable dependiente (respuesta), atendiendo a la mayor incertidumbre intrínseca asociada al cálculo de SUV_{max} y su mayor reproducibilidad. Para que los valores de SUV_{med35} (a partir de ahora SUV) estuvieran en un rango semejante al de los datos de expresión que se usarían para predecirlos (variables independientes), así como para facilitar un mejor ajuste a una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica en base 2 del SUV, que es la que se usaría en la elaboración del modelo predictivo. Es importante reseñar que el estudio del gráfico (*boxplot*) de los datos transformados logarítmicamente del SUV de los pacientes del *training set* mostró la ausencia de valores muy extremos (*outliers*) entre éstos.

3.3.3.3 Selección de las sondas mejores para la elaboración del modelo predictivo

Una vez preparados los arrays conteniendo las variables independientes que se usarían en la predicción del SUV fue evidente que el número de variables (22814 sondas), incluso después de haber hecho un filtrado de genes con escasa varianza, era todavía excesivo para la construcción de un modelo predictivo. Según la experiencia de Hastie y cols. [141], particularmente en los métodos que usan componentes principales, el factor clave para el buen funcionamiento de este tipo de modelos predictivos con un número de variables mucho más grande que el de observaciones, es la selección de las mejores variables (en nuestro caso sondas) filtrando las más “ruidosas”. Este planteamiento se hizo también extensivo a otros potenciales métodos predictivos que pudieran usarse en nuestra situación. Por este motivo, antes de intentar el ajuste de un modelo determinado, se realizó una selección de las sondas que mejor se correlacionaban con el SUV siguiendo las recomendaciones de Hastie y cols. [141]. En breve, primero se obtuvo el coeficiente de regresión univariada de cada una de las 22814 sondas en los pacientes del *training set* contra el SUV, y se seleccionaron aquellas cuyo coeficiente de regresión univariada tenía un umbral de ± 1 (se eligieron los valores ≤ -1 y $\geq +1$), descartando las demás. La determinación de este umbral se hizo en base a *10-fold cross-validation* (*10-fold CV*), de acuerdo a la selección mediante el valor del *likelihood ratio* del punto de corte óptimo dentro del rango de los coeficientes de regresión frente al SUV de las sondas filtradas [-2.14,1.71], tras el cálculo de los primeros componentes principales. Se usó la librería *superpc* de R para esta selección, creada por los autores antes mencionados [141]. El número de sondas seleccionadas con este procedimiento fue de 909, que corresponden a 742 genes únicos asociados a un símbolo y 62 sondas no asociadas a un gen reconocible. Las 909 sondas fueron incluidas en la generación del modelo multivariado, considerando a cada una como predictor (variable independiente). De este modo se permite que cada uno de los modelos estadísticos utilizados asigne el valor más apropiado para cada sonda, con la intención de incrementar la precisión de los mismos. También se han mantenido las 62 sondas no asociadas a símbolos pues algunas de ellas podrían tener una contribución importante en los modelos ajustados. El listado íntegro de las 909 sondas usadas y sus símbolos correspondientes se muestran en el anexo 1.

3.3.3.4 Análisis bioinformático de las sondas seleccionadas

Para la realización del agrupamiento jerárquico se usó la función *hclust* de R, usando como métrica de la distancia el coeficiente de correlación de Spearman y como *linkage* el completo. Además para la generación del *heatmap* presentado se usó la librería *gplots*.

Para evaluar el potencial papel pronóstico de los genes usados en la construcción del modelo predictivo del SUV, se han usado 3 series de tumores de mama primarios normalizados y depositadas en repositorios públicos, comprendiendo un total de 856 microarrays de pacientes procesados conjuntamente por Haibe-Kains y cols. [142], que incorporan datos de supervivencia libre de metástasis en 850 de ellos. Todos los microarrays de estas series son de la plataforma HGU-133A de *Affymetrix*. Para la elaboración del agrupamiento jerárquico se realizó la conversión del mayor número posible de las sondas de Agilent utilizadas en nuestro estudio a las correspondientes de *Affymetrix* mediante el recurso ID conversor de *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*. Posteriormente se identificaron y aislaron las sondas correspondientes de los microarrays de pacientes con cáncer de mama y se aplicó el agrupamiento jerárquico de la misma manera y con el mismo método usado para el agrupamiento de los 71 pacientes correspondientes al *training set* del presente estudio, aislándose los 5 *clusters* principales de esta nueva población mediante la función *cutree* de R. Estos *clusters* contenían el siguiente número de pacientes: C1 (n=232), C2 (n=161), C3 (n=71), C4 (n=232) y C5 (n=154). La supervivencia de cada uno de los 5 *clusters* fue analizada mediante el método de Kaplan-Meier y el test de significación estadística log-rank. También se usó un modelo de regresión de Cox para estimar el *hazard ratio* (HR), primero de forma univariada para los pacientes de los 5 *clusters* obtenidos y posteriormente en un análisis multivariado ajustado a los datos pronósticos conocidos disponibles en la serie.

Para la interpretación de los fenómenos biológicos que subyacen a los genes incluidos en el modelo se ha utilizado el recurso público *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* (<https://david.ncicrf.gov/>). Para contrastar estos datos, y profundizar en las posibles vías de señalización y metabólicas, también se ha usado el recurso público *Consensus Pathway Database, release 31* (<http://ConsensusPathDB.org>) que incorpora algunos estudios de sobrerepresentación estadística menos representados en *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*.

Para el estudio analítico de redes de interacción proteína-proteína construidas a partir de los genes seleccionados en este estudio se ha utilizado el recurso bioinformático STRING 10.0 (<http://string-db.org/>). El dintel usado para establecer los enlaces (*edges*) entre los vértices fue de 0.7 (*“high confidence”*). Se estudiaron por separado dos subredes, una con aquellos genes correlacionados positivamente con el SUV y la otra con los correlacionados negativamente. También se ha llevado a cabo agrupamiento jerárquico con algoritmo *fastgreedy* de manera independiente, para proteínas asociadas positiva o negativamente con el SUV, con la finalidad de asignar *membership* entre las mismas. Se han estudiado otras características de las redes como son la centralidad o el grado de conectividad mediante la librería *igraph* de R.

El *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) se efectuó mediante la aplicación del método ssGSEA (*Single Sample GSEA*) —tal y como se implementa en la librería GSEA de R— al total de los datos normalizados y filtrados del *training set*, usando las firmas obtenidas de la *Molecular Signatures Database* v5.1 (MSigDB) correspondientes a C2 (*curated gene sets*) y mantenida por el *Broad Institute*. Los *scores* obtenidos con el método ssGSEA para cada firma y para cada microarray de los 71 pacientes del *training set* se correlacionaron de manera pareada con el SUV transformado de cada paciente (correlación de *Pearson*). El método ssGSEA se ha utilizado con los parámetros por defecto descritos por Barbie y cols. [143]. Se ha incluido el estudio bioinformático ssGSEA por su mayor sensibilidad para la detección de los cambios coordinados en grupos funcionales de genes relacionados con vías de señalización.

3.3.3.5 Selección del modelo multivariado de predicción del SUV

Una vez escogidas las mejores sondas para la construcción del modelo, se pasó a seleccionar el método de regresión a emplear, con el objetivo de predecir una variable dependiente continua, el SUV. Para ello se analizaron cuatro métodos diferentes de regresión de uso habitual en este ámbito: *Partial Least Squares* (PLS) [144], *Principal Component Regression* (PCR) [144], *Random Forest* (RF) [145] y *Support Vector Machines* (SVM) [146]. Los dos primeros métodos (PLS y PCR) son lineales y fueron elegidos en base a las consideraciones de linealidad y normalidad de la variable SUV. Los dos últimos (RF y SVM) son métodos no lineales de uso extensivo en genómica (así como en otras áreas de la medicina). El uso extenso en

la literatura de estos dos métodos, que se consideran *state of the art* en modelización predictiva, se debe en gran parte al buen funcionamiento de los mismos en todo tipo de situaciones incluso complejas.

PCR es un método no supervisado que hace uso de componentes principales. Componentes principales es una técnica estadística consistente en reducir todos los predictores a un nuevo número menor de los mismos –no superior al número de observaciones– derivados de combinaciones lineales de los originales. Estos componentes principales son entonces usados como nuevos predictores en una regresión lineal en PCR. Los componentes principales tratan de capturar las direcciones de máxima variabilidad de los datos que no necesariamente correlacionan con la respuesta a predecir. En el presente estudio es más apropiado llamar a PCR procedimiento “semisupervisado” (más que no supervisado) ya que se ha llevado a cabo únicamente con las variables seleccionadas por su buena correlación con el SUV. El algoritmo usado para obtener los componentes principales en el método PCR aplicado en este estudio es la descomposición de valores singulares (*singular value decomposition*) que es el que se considera más preciso para este propósito. Los predictores fueron estandarizados antes de ajustar el modelo. Se ha obtenido el número de componentes necesarios en PCR, en este caso 18.

PLS es sin embargo, un método supervisado de reducción de dimensiones que identifica nuevos predictores que son combinaciones lineales de los originales, y que no sólo hace uso de la variación encontrada en los predictores (las sondas en nuestro caso) sino que también hace uso de la respuesta (el SUV). Este método trata de encontrar direcciones (componentes) en los datos que ayuden a explicar simultáneamente tanto la variabilidad de las sondas como la del SUV. Los predictores fueron estandarizados antes de ajustar el modelo. El algoritmo usado fue el de los *scores* ortogonales y el parámetro que se determinó para el ajuste del modelo resultó ser de 3 componentes. El método PLS usado aquí es conocido en la literatura como *thresholded-PLS*, debido a la selección hecha de los mejores predictores en relación con el SUV [141].

SVM, aunque fue inicialmente usado para clasificación, posteriormente se ha adaptado también para regresión, buscando minimizar el efecto de *outliers* en las ecuaciones de regresión mediante el uso de una función en la que se establece un umbral según el cual, puntos con residuales dentro del umbral no contribuyen al

ajuste de la regresión, mientras que puntos con una diferencia absoluta mayor sí. Los predictores fueron estandarizados antes de ajustar el modelo. Para este trabajo se ha usado un *kernel* de función básica radial (que permite el ajuste de regresiones no lineales) en el que el parámetro sigma (σ) fue estimado analíticamente, su valor fue 0.0006091206. El parámetro del coste, que es la penalización establecida por el usuario para residuales grandes, correspondió a un valor de 8.

RF es un *ensemble*, es decir una serie de modelos entrenados que predicen mejor que cada modelo considerado individualmente. El algoritmo consiste en la generación de una muestra obtenida mediante *bootstrap* –método de remuestreo propuesto por Bradley Efron en 1979 [147]– de los datos originales y se entrenan varios modelos de árboles decisorios en esta muestra. Se van haciendo particiones en las que en cada una se seleccionan de manera aleatoria un número concreto de predictores (k) entre los disponibles, seleccionando los mejores para partir los datos. Este proceso se repite hasta completar el árbol. En este trabajo se ha seleccionado como número de árboles a usar 1000 y el parámetro k óptimo hallado fue de 2.

En la selección de los parámetros óptimos para cada modelo, referidos en los párrafos previos, se eligieron aquellos que lograban minimizar el *root mean squared error* (RMSE) y maximizar *RSquared* (R^2) en cada ajuste, utilizando para ello una *10-fold CV* repetida 5 veces. En caso de conflicto entre RMSE y R^2 se ha primado la minimización del RMSE sobre la maximización del R^2 . Además de considerarse el RMSE más intuitivo, es el más usado en la literatura a la hora de caracterizar en más detalle los modelos seleccionados. De hecho, R^2 se considera más una medida de correlación entre los valores observados y predichos que una medida real de precisión del modelo

Se define RMSE mediante la siguiente fórmula:

$$\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

Siendo en nuestro caso “ n ” el número de pacientes, “ y_i ” el SUV medido, e “ \hat{y}_i ” la predicción (ambos datos transformados logarítmicamente) de la misma muestra “ i ”.

Aunque hay varias fórmulas para el cálculo de R^2 , en este trabajo se ha utilizado la más simple de ellas, consistente en calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de SUV observados y predichos (ρ) y elevarlo al cuadrado. Este valor está muy influenciado por la varianza de la respuesta y sus resultados oscilan entre 0 y 1 (en el mejor de los casos).

Para la realización de la *10-fold CV* repetida 5 veces se seleccionó la misma semilla a partir de la cual se generaron de manera reproducible los números aleatorios usados en la generación de particiones usadas para la *10-fold CV*, de manera que las particiones de los datos del *training set* fueron idénticas en los 4 modelos empleados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la *10-fold CV* es el proceso que consiste en realizar en un conjunto de datos determinados 10 particiones proporcionales, separando una para testar el modelo generado en las 9 restantes (obteniendo el RMSE y el R^2 del modelo en la parte guardada que no ha participado en la generación del modelo). Por turno, cada una de las 9 particiones es guardada para testar el modelo generado con las otras 9, de manera que al final del procedimiento se han testado 10 modelos diferentes (uno por cada una de las 10 particiones generadas). En este trabajo se ha repetido 5 veces dicho procedimiento, obteniéndose por tanto datos de 50 modelos generados (por cada uno de los métodos usados) sobre 50 particiones diferentes de los datos del *training set*, de los que se obtuvo el valor medio de RMSE y R^2 estimados en cada partición de los datos. Tal como se mencionaba anteriormente estas 50 particiones (10 x 5 repeticiones) para cada uno de los modelos empleados han sido idénticas debido a que se han generado a partir de la misma semilla de generación de número aleatorio, y por tanto la eficiencia (los promedios del RMSE y del R^2) de cada modelo con sus parámetros correspondientes ajustados en dicho proceso es directamente comparable.

Se ha realizado un t-test con ajuste de Bonferroni (para comparaciones múltiples) para comparar la diferencia entre las medias de RMSE obtenidas en cada par posible de modelos (la distribución de los 50 valores de cada modelo no se separaban de manera importante de una distribución normal, comprobado mediante tests de normalidad). Y un test de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni para comparar las diferencias entre las medias del R^2 de cada par posible de modelos (la distribución de los 50 valores de cada modelo se separaban muy significativamente

de una distribución normal, tal como se comprobó con tests de normalidad). No obstante, los resultados fueron muy semejantes a los del t-test al aplicar el test de Wilcoxon sobre las diferencias de medias de los valores de RMSE en cada par de modelos obteniéndose las mismas conclusiones. Una vez seleccionado el modelo con un menor RMSE, se estimó el RMSE sobre el *validation set*, que tal y como se comentó anteriormente constituían un grupo de datos independientes, y por tanto no expuestos previamente al modelo elegido.

El *software* empleado para todos los aspectos relacionados con la selección del modelo multivariado fue el entorno estadístico R versión 3.2.5 (<https://cran.r-project.org/>) y las librerías *superpc*, *caret*, *pls*, *RandomForest* y *kernelab*. Para la preparación de los datos de expresión de los microarrays se usaron las librerías *limma* y *genefilter* del proyecto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Para la estadística descriptiva se usó el *software* estadístico SPSS versión 15.0.1 para Windows 7. El resultado del comando de *R sessionInfo()*, ejecutado tras cargar todas las librerías usadas para este estudio, que proporciona entre otras cosas las versiones usadas de cada una de las librerías del entorno estadístico R se adjunta en el anexo 2. En el anexo 3 se mencionan los autores del *software* (librerías) relacionados con el entorno estadístico R usado en este estudio.

Para la comprobación de la eficiencia de predicción de la firma PLS-3 con un *set* de sondas reducido, se han usado las sondas con un coeficiente de regresión positivo con el SUV. Se testaron, usando *10-fold CV*, el RSME de la firma compuesta por un número reducido de sondas (49, 99, 149, 249 y 332) y que incluían aquellas sondas con coeficiente de regresión más alto en cada caso. Las firmas PLS-3 reducidas con las que se minimizara el RMSE, se testaron en el *validation set* (n=13).

Se comprobó que el método PLS-3 seguía siendo, en este caso de reducción del número de sondas, el que de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$) producía menor RMSE en comparación con SVM y RF, siguiendo la metodología aplicada en la selección del modelo con las 909 sondas (*10-fold CV* repetida 5 veces con los parámetros de todos los modelos reajustados para minimizar el RMSE). También se comprobó que PCR no resultaba significativamente diferente de PLS en esta situación ($p > 0.05$). Esta comprobación se hizo con las 150 y 250 sondas con coeficientes de regresión más altos que se correlacionaban positivamente con el SUV.

4. RESULTADOS

4.1 PACIENTES DEL *TRAINING SET*

En total en este trabajo se incluyeron en el *training set* 71 pacientes, 40 mujeres (56%) y 31 hombres (44%), con un rango de edad entre (28-80) años y una mediana de 58 años. Se excluyeron 4 pacientes al no poderse identificar el tumor activo en la imagen PET/CT. En 3 pacientes, que mostraban estudios repetidos, se seleccionó el primero de ellos para su inclusión en el estudio. Las histologías del tumor primario se distribuyeron entre las más prevalentes en la población, describiéndose en la tabla IV.

Tabla IV. Características de los pacientes incluidos en el *training set* según origen histológico y localización de la biopsia.

Histología	Total (n=71)	Porcentaje (%)
Ca. Colorrectal	9	12,7
Ca. de Mama	8	11,3
Sarcoma de Partes Blandas	8	11,3
Ca. del Tracto Genitourinario	7	9,9
Ca. Ovario	7	9,9
Ca. Pulmón	7	9,9
Ca. Páncreas	6	8,5
Ca. Cabeza-Cuello	5	7,0
Ca. Esófago	4	5,6
Ca. Tiroides	2	2,8
Ca. Vías Biliares	2	2,8
COD	1	1,4
Ca. Gástrico	1	1,4
Linfoma no Hodgkin	1	1,4
Melanoma	1	1,4
Ca. de Piel (Merckel)	1	1,4
Ca. Renal	1	1,4

Localización Biopsias	Total (n=71)	Porcentaje (%)
Hígado	25	35,2
Implante Retroperitoneal	16	22,5
Adenopatía	13	18,3
Implante mucosa Cabeza y Cuello	3	4,2
Implante Cutáneo	3	4,2
Implante Pleural	3	4,2
Pulmón	3	4,2
Implante Mamario	2	2,8
Mediastino	2	2,8
Páncreas	1	1,4

En esta serie, heterogénea por el origen tumoral, predominaron los pacientes con carcinomas colorrectales (13%), seguidos por pacientes con carcinomas de mama (11%), sarcomas de partes blandas (11%), carcinomas del tracto genitourinario (10%), carcinomas de ovario (10%), de pulmón (10%) y de páncreas (8.5%).

4.2 CUANTIFICACIÓN FDG PET/CT

Los estudios de PET/CT incluidos en este trabajo, corresponden al estudio basal metabólico realizado para valorar la respuesta a los fármacos seleccionados por su perfil genético de sensibilidad o resistencia determinadas por microarray, en pacientes afectos de tumores metastásicos resistentes a múltiples líneas de tratamiento.

En el *training set* los niveles de glucemia basal se encontraron entre 66-149 ng/ml, con una media de 100.8 ng/ml, no requiriéndose en ningún paciente la administración previa de insulina para la realización del estudio. La media de la dosis inyectada de FDG fue de 425.5MBq (366.3-495.8 MBq), siendo LBM medio de 52.3 (29.5-81.8). Los estudios PET/CT se adquirieron a los 90±10 minutos de la administración endovenosa de la FDG.

Las medidas de cuantificación de actividad se realizaron sobre la misma localización seleccionada para biopsia, correspondiendo en su mayoría a metástasis hepáticas (35%), implantes retroperitoneales (23%) o adenopatías (18%). Los datos de las ubicaciones de la lesiones metastásicas cuantificadas y sobre las que se realizaron los microarrays se detallan en la tabla IV.

Mediante la disposición de VOIs de isocontorno correspondiente al 35% del SUV_{max} , situada sobre la lesión metastásica en la que se realizó el microarray, se obtuvieron los siguientes valores de cuantificación: SUV_{max} , SUV_{med35} , SUL, SUV_{glu} , MTV, TLG y T/N. Sus resultados, media y rango, se recogen en la tabla V.

Tabla V. Datos poblacionales y de cuantificación del *training y validation sets*; media y rango.¹Mediana y rango.²Datos perdidos: 3 en el *training set* y 1 en el *validation set*.

<u>Datos poblacionales</u>	Training set (n=71)	Validation set (n=13)
Edad (años) ¹	58 (28-80)	58 (36-77)
Mujeres/Hombres	40/31	9/4
LBM	52,3 (29,5-81,8)	47,9 (32,8-60,7)
Glucemia basal (mg/dL)	100,8 (66-149)	100,1 (78-126)
Dosis inyectada (mCi)	11,5 (9,9-13,4)	11,3 (10,0-12,9)
<u>Datos cuantificación PET</u>		
Diámetro de la lesión (cm)	6,4 (1,5-18,9)	8,1 (2,1-18,3)
SUV_{max}	11,8 (3,7-31,3)	12,3 (2,7-21,7)
SUV_{med35}	6,7 (2,4-16,7)	6,5 (2,0-10,7)
SUL ²	4,8 (1,5-11)	5,1 (2,3-8,8)
SUV_{glu}	6,7 (2-14,9)	6,5 (2,1-11,5)
MTV (cm ³) ²	45,2 (0,7-434)	197,4 (2,1-1009)
TLG ²	358,7 (2,3-3958,1)	1784 (4,1-9058,1)
T/N	9,5 (1,4-35,8)	10,9 (2,5-26,8)

La mediana del diámetro máximo de las lesiones analizadas en el *training set* fue de 6.4 cm (rango 1.5-18.9 cm) y presentaron un MTV medio de 45 cm³ (rango 0.7-434 cm³). No se pudo determinar el SUL en 3 pacientes por no disponerse de la talla de los pacientes. En otros 3 no se pudo determinar el tamaño de la lesión por ser la afectación difusa y masiva y exceder la capacidad de cálculo del programa. En la figura 16 se muestra uno de los pacientes que presentaba una afectación

masiva. Los diámetros de los ROIs utilizados para determinar la ratio tumor/fondo obtenidos oscilaron entre 1.5 y 18.9 cm, con una mediana de 5.6 cm.

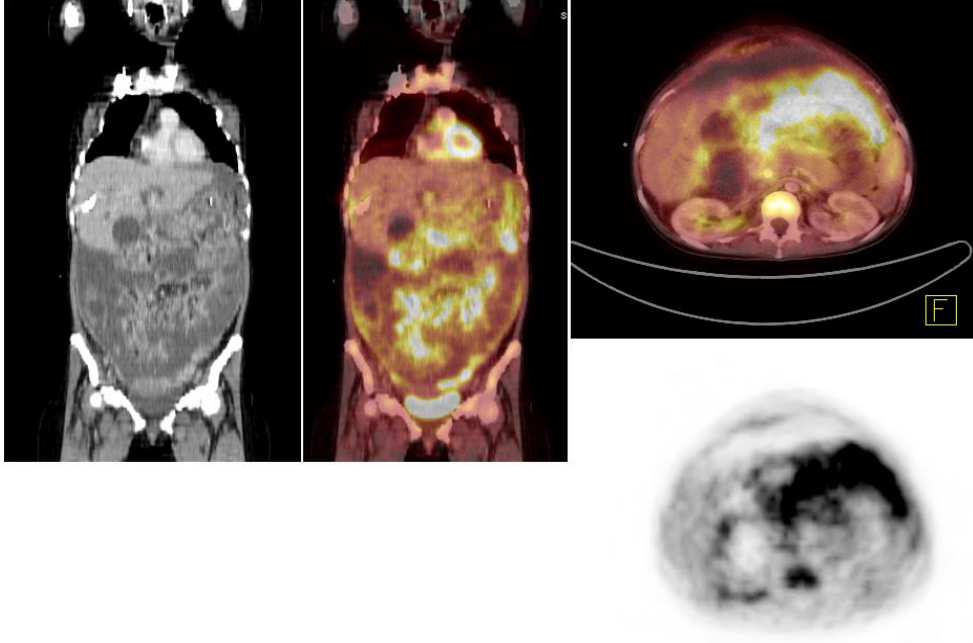


Fig 16. Imágenes coronales y axiales en un paciente con afectación peritoneal masiva.

En el *validation set*, constituido finalmente por 13 pacientes, los estudios de PET/CT se realizaron con la misma finalidad, estudio basal metabólico para valoración posterior de la respuesta a los fármacos seleccionados por microarray, e igualmente se siguió el mismo protocolo de adquisición, procesado y cuantificación. En este caso, a diferencia de la muestra previa en la que todas las lesiones analizadas fueron metástasis, se incluyeron dos tumores primarios, que correspondían a un paciente con adenocarcinoma de páncreas y otro con un tumor de vías biliares. Los datos de cuantificación y poblacionales de esta serie se recogen igualmente en la tabla V, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$ para todas las variables).

4.3 AGLOMERACIÓN JERÁRQUICA DE LAS 909 SONIDAS SELECCIONADAS PARA LA ELABORACIÓN DEL MODELO

Con el propósito de ver si las sondas seleccionadas eran capaces de discriminar distintos grupos de pacientes en relación al SUV y no a otros datos clínico-patológicos, particularmente el diagnóstico histológico o la localización de la biopsia, se realizó aglomeración jerárquica en los pacientes del *training set*. Este método no supervisado establece agrupaciones de los datos que presentan un patrón de expresión semejante de las 909 sondas consideradas. En el *heatmap* de la figura 17 se muestra el resultado de aplicar esta técnica.

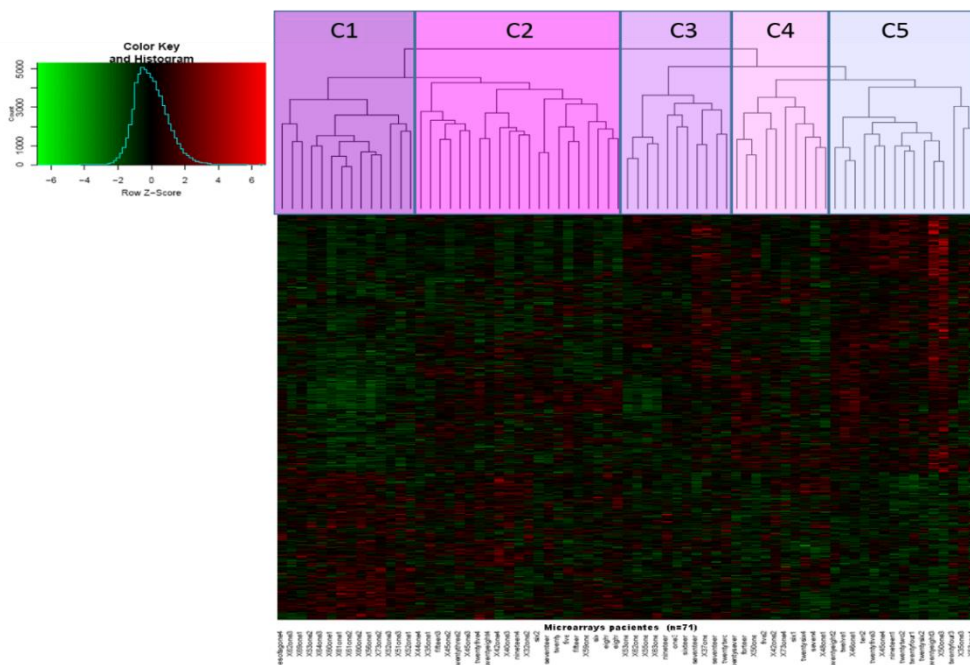


Fig. 17. *Heatmap* del *training set*. En las hileras del gráfico se representan las 909 sondas empleadas y en las columnas las muestras correspondientes a los 71 pacientes.

A la vista del *heatmap* se pueden distinguir 5 *clusters* (C1-C5), que se indican en la figura sobre el dendrograma. Las medias de los SUV de los microarrays pertenecientes a cada uno de los 5 *clusters* se muestran en la tabla VI.

La comparación de éstas mediante ANOVA muestra un resultado significativo ($p=0.001$) a expensas sobre todo de la diferencia entre la media del SUV del C1 *vs* las medias de los demás *clusters* (t-test $p<0.05$ para todas las

comparaciones entre C1 y cada uno de los demás *clusters*), así como t-test $p=0.076$ de significación al límite entre el C2 y el C5. Por tanto este procedimiento no supervisado distingue *clusters* con diferencias significativas entre las medias de SUV.

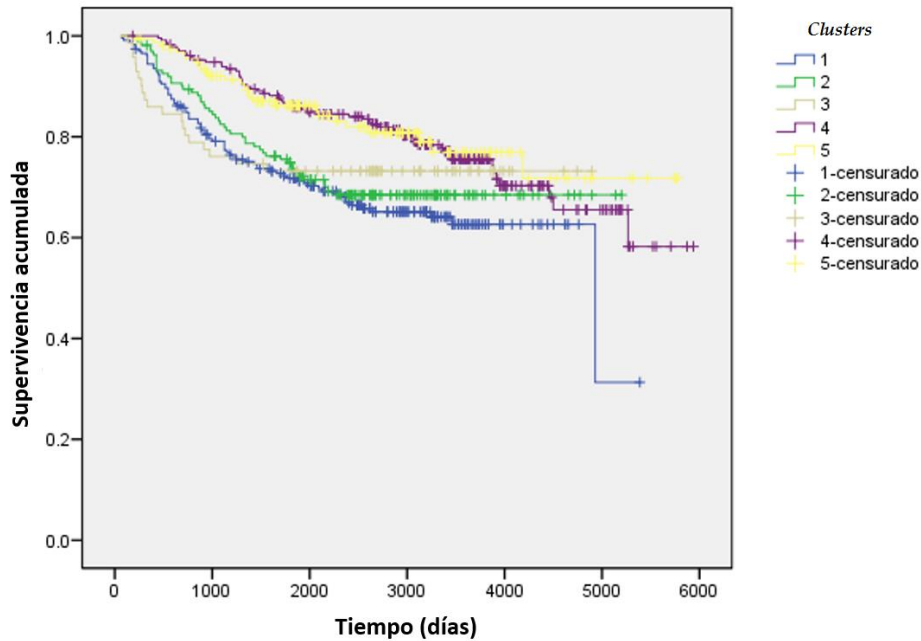
Tabla VI. Resultados del SUV por *cluster*. ANOVA para diferencia de las medias de SUV estadísticamente significativa ($p=0.001$).

<i>Cluster</i>	n	Media SUV _{med35}	SD	Mínimo SUV	Máximo SUV
C1	14	9,28	2,88	5,27	16,69
C2	21	6,89	3,08	2,52	13,63
C3	11	6,46	2,86	3,78	12,08
C4	10	5,28	1,69	2,62	8,38
C5	15	5,21	2,08	2,35	9,16

Sin embargo, ninguno de los grupos mayoritarios de subtipos histológicos de tumores de esta serie quedaba agrupado en un único *cluster* (p.e. mama, colorectal, sarcoma, genitourinario, ovario, pulmón o páncreas), descartando así que los genes usados discriminen el fenotipo tumoral de estos tumores. El único grupo mayoritario tumoral de esta serie con un valor medio de SUV significativamente superior al de la mayoría de los otros subtipos fue el adenocarcinoma pulmonar, cuyos casos aparecen similarmente distribuidos en 3 *clusters* diferentes. El resto de subtipos tumorales más representados en esta serie tenían medias de SUV que no diferían significativamente entre ellos, y además se encontraban distribuidos en un mínimo de dos o más *clusters*. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias del SUV entre los tumores metastásicos de localización hepática (biopsias hepáticas) y el resto de localizaciones (t-test $p=0.348$), y de manera similar los microarrays procedentes de biopsias hepáticas estaban ampliamente distribuidos entre los 5 *clusters*.

Para comprobar si los genes seleccionados para predecir el SUV no sólo separaban los pacientes de manera no supervisada de acuerdo a agrupaciones con medias de SUV diferentes, se utilizó el mismo procedimiento de agrupación

jerárquica en una serie externa de pacientes con cáncer de mama primario y datos de supervivencia libre de metástasis (n=850).



Nuestro objetivo fue valorar el potencial pronóstico de estos genes en una serie amplia de pacientes con un mismo tipo histológico y en estadios precoces de la enfermedad. En la figura 18 se muestra la gráfica *Kaplan-Meier* realizada con los pacientes agrupados en los 5 clusters principales identificados. Son apreciables diferencias estadísticamente significativas en supervivencia libre de metástasis (*log-rank test* $p=0.001$). Particularmente los clusters C1, C2 y C3 presentaron peor supervivencia que C4 y C5. Se confirmó este resultado con un modelo de Cox, utilizando como punto de comparación el cluster C1, tal y como se muestra en la tabla VII. Sin embargo, cuando se realizó un análisis multivariado incorporando todos los factores pronósticos conocidos y disponibles en esta serie como la afectación ganglionar axilar o el grado tumoral entre otros, esta significación estadística no se mantuvo (datos no mostrados).

Tabla VII. Resultados del test de Cox en la serie de pacientes de cáncer primario de mama agrupando los pacientes en los 5 *clusters*.

<i>Clusters</i>	HR	CI 95%	<i>p-value</i>
C2	0.848	(0.594 - 1.211)	0.364
C3	0.759	(0.460 - 1.252)	0.280
C4	0.555	(0.394 - 0.783)	0.001
C5	0.485	(0.315 - 0.747)	0.001

Por tanto, de los resultados expuestos usando agrupamiento jerárquico con los genes seleccionados para la creación del modelo multivariado, se confirma que estos genes pueden discriminar grupos de pacientes con medias de SUV estadísticamente diferentes en nuestro *training set*. Sin embargo, los *clusters* de pacientes separados por estos mismos genes en una serie numerosa (n=850) de cáncer de mama primario no tienen un valor pronóstico independiente, lo parece apuntar a la selectividad de estos genes para discriminar el SUV, y no otras características como la supervivencia.

Estos resultados confirmarían que los genes seleccionados son adecuados para la elaboración de un modelo multivariado de predicción del SUV, como se expondrá más adelante.

4.4 PROCESOS BIOLÓGICOS RELEVANTES ENTRE LOS GENES SELECCIONADOS

Para ganar cierta perspectiva sobre las funciones biológicas representadas en los genes seleccionados para la construcción del modelo se utilizó fundamentalmente la base de datos *DAVID* en su versión 6.7. Esta información se complementó con la consulta de dos bases más: *Consensus Pathway Database rel 31* y *STRING 10.0*. En la tabla VIII se muestra un listado parcial de los procesos biológicos más sobrerrepresentados estadísticamente entre el subgrupo de los genes seleccionados con correlación positiva con el SUV, según aparecen en el recurso público *DAVID Database*. El listado completo de procesos biológicos se incluye en el anexo 4.

Tabla VIII. Listado de los 30 primeros procesos biológicos del subgrupo de genes correlacionados positivamente con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0006396~RNA processing	10,3	1,87E+08	2,54985E+11
GO:0022613~ribonucleoprotein complex biogenesis	4,8	1,09E+10	0,007
GO:0034470~ncRNA processing	4,4	8,05E+10	0,036
GO:0034660~ncRNA metabolic process	4,8	1,21E+11	0,040
GO:0046148~pigment biosynthetic process	22,1	2,23E+12	0,059
GO:0008380~RNA splicing	5,2	2,32E+11	0,051
GO:0016071~mRNA metabolic process	0,6	2,91E+10	0,055
GO:0018279~protein amino acid N-linked glycosylation via asparagine	14,7	3,24E+11	0,054
GO:0018196~peptidyl-asparagine modification	14,7	3,24E+11	0,054
GO:0042254~ribosome biogenesis	3,3	3,70E+11	0,055
GO:0042440~pigment metabolic process	22,1	4,42E+12	0,058
GO:0006397~mRNA processing	5,2	7,42E+11	0,088
GO:0009101~glycoprotein biosynthetic process	3,3	0,002	0,203
GO:0070085~glycosylation	2,9	0,002	0,228
GO:0006486~protein amino acid glycosylation	2,9	0,002	0,228
GO:0043413~biopolymer glycosylation	2,9	0,002	0,228
GO:0065003~macromolecular complex assembly	7,4	0,003	0,273
GO:0006487~protein amino acid N-linked glycosylation	18,4	0,004	0,277
GO:0008033~tRNA processing	22,1	0,005	0,329
GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions	2,9	0,007	0,409
GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome	2,9	0,007	0,409
GO:0000377~RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	2,9	0,007	0,409
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	7,4	0,007	0,393
GO:0022403~cell cycle phase	5,1	0,007	0,386
GO:0006399~tRNA metabolic process	25,7	0,007	0,382
GO:0000279~M phase	4,4	0,008	0,404
GO:0007049~cell cycle	7,7	0,008	0,391
GO:0009100~glycoprotein metabolic process	3,3	0,009	0,406
GO:0006364~rRNA processing	22,1	0,010	0,447
GO:0050866~negative regulation of cell activation	18,4	0,011	0,463

En relación con los genes que más contribuyen positivamente al aumento del SUV cabe destacar los relacionados con el procesamiento del mRNA y del tRNA, la biogénesis de ribosomas y la síntesis y procesamiento de proteínas. También aparecen genes involucrados en distintas fases de la mitosis del ciclo celular (tabla VIII). Entre los relacionados negativamente con el SUV encontramos genes de adhesión y de citoquinesis celular, de reorganización del citoesqueleto y genes relacionados con la glucogenogénesis (tabla IX).

Tabla IX. Listado de los 15 primeros procesos biológicos del subgrupo de genes correlacionados negativamente con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0007160~cell-matrix adhesion	2,9	9,20E+08	0,002
GO:0031589~cell-substrate adhesion	2,9	2,61E+10	0,002
GO:0030029~actin filament-based process	4,2	1,27E+11	0,008
GO:0007155~cell adhesion	8,0	1,46E+11	0,007
GO:0022610~biological adhesion	8,0	1,47E+11	0,005
GO:0007015~actin filament organization	22,2	4,01E+10	0,012
GO:0030036~actin cytoskeleton organization	37,8	7,40E+10	0,019
GO:0051493~regulation of cytoskeleton organization	2,9	7,46E+10	0,017
GO:0051017~actin filament bundle formation	13,3	9,63E+10	0,019
GO:0005979~regulation of glycogen biosynthetic process	11,1	2,34E+11	0,042
GO:0032885~regulation of polysaccharide biosynthetic process	11,1	2,34E+11	0,042
GO:0010962~regulation of glucan biosynthetic process	11,1	2,34E+11	0,042
GO:0048771~tissue remodeling	17,8	2,91E+12	0,047
GO:0032881~regulation of polysaccharide metabolic process	11,1	3,14E+12	0,046
GO:0031529~ruffle organization	0,9	9,29E+11	0,121

Al contrastar en dos recursos bioinformáticos más el significado biológico de los genes asociados con el SUV, *Consensus Pathway Database rel.31* y *STRING 10.0*, se confirmaron los hallazgos previos. Adicionalmente se encontraron entre los 20 primeros puestos ordenados por su significación estadística corregida (*q-value* o *false discovery rate*) del subgrupo de genes con correlación positiva, procesos

relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, el ciclo de las pentosas fosfato y la glicólisis, y fenómenos relacionados con el microambiente tumoral (receptores y señalización linfocitarios: CD4, CD3 y PD1 y de depuración o *scavenging receptors*). En el subgrupo de genes con correlación negativa se destacan adicionalmente procesos de angiogénesis, que no aparecían tan destacados en el análisis con la base de datos DAVID. También se confirmaron los resultados previos: activación de RHO GTPasas (participan en la traducción y transducción de señales, la motilidad celular y el transporte intracelular) y de señalización de E-cadherina (principales moléculas de adhesión celular). El listado completo de procesos biológicos según estas dos bases de datos se incluye en los anexos 5 y 6.

Se realizó complementariamente un análisis mediante el recurso bioestadístico STRING 10.0 de las redes de interacción proteína-proteína generadas a partir de los genes seleccionados. Se incluyeron las 909 sondas, analizándose por separado los que mostraban una correlación positiva o negativa. Los resultados completos se muestran gráficamente en el anexo 7, para un *score* de interacción con un intervalo mínimo de confianza >0.7 , y eliminando del mismo aquellos nodos sin conexión aparente, según la metodología publicada por los autores del recurso [148]. En la tabla X se recogen el número total de nodos e interacciones detectadas frente a las esperadas en ambos grupos, red global de genes correlacionados positivamente y los correlacionados negativamente, mostrándose en ambos casos diferencias estadísticamente significativas (*p-value*: 2.43×10^{-13} y 0, respectivamente).

Tabla X. Nodos e interacciones (detectadas y esperadas) entre las proteínas generadas por los genes de correlación positiva y negativa con el SUV ($p < 0.05$).

	Interacciones genes CR. positiva	Interacciones genes CR. negativa
nº nodos	259	428
nº enlaces	123	383
nº enlaces esperados	59	187
<i>PPI enrichment (p-value)</i>	2.43×10^{-13}	0

Estas relaciones proteína-proteína se han obtenido de manera independiente en ambos subgrupos de genes con correlación positiva y negativa con el SUV de la red global mediante la realización de agrupamiento jerárquico usando el algoritmo

fastgreed. Entre las observadas se han seleccionado aquellos *clusters* con mayor significación estadística entre los enlaces encontrados y esperados.

Entre las asociaciones proteicas más relevantes por el número de interacciones observadas a partir de los genes con correlación positiva con el SUV encontramos chaperonas (HSP90B1, DNAJA1) y otras proteínas que intervienen en el procesamiento, plegamiento (CALR) y transporte de proteínas (CLPB), algunas con especial relevancia en situaciones de privación de oxígeno (HYOU1). También aparecen enzimas que intervienen en la glicosilación de proteínas (RPN1, STT3A, MAGT1 y DDOST). El *cluster* correspondiente a estas interacciones se muestra en el área 1 de la figura 19. Otro *cluster* relevante se muestra en el área 2 de la figura 19, y está formado por diferentes ribonucleoproteínas que intervienen en distintas fases de preparación del pre-mRNA para lograr su funcionalidad, ensamblaje (NHP2L1 y HNRNPL), elongación (EFTUD2) y *splicing* (SUGP1, TXNL4A).

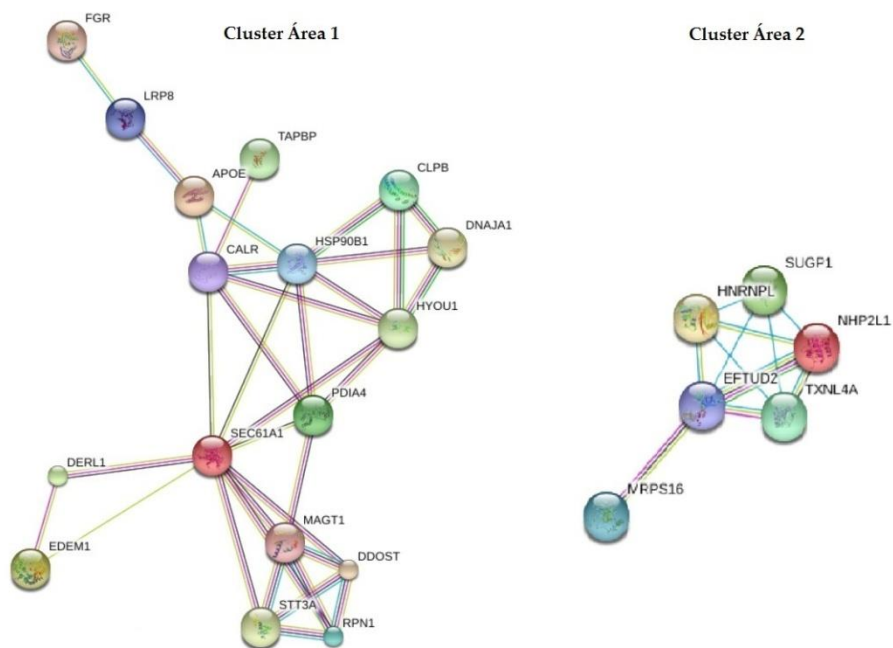


Fig. 19. Área 1: enzimas relacionadas con el procesamiento de proteínas (proteínas enlazadas: 17; interacciones encontradas: 34; interacciones esperadas: 1; *p-value*: 0). Área 2: enzimas involucradas en la preparación del pre-mRNA (proteínas enlazadas: 6; interacciones encontradas: 11; interacciones esperadas: 0; *p-value*: 9.34×10^{-10}).

El número total de enlaces y su significación estadística frente a los esperados se muestran en cada pie de figura. Puede existir alguna discrepancia en su representación espacial para una mayor comprensión, pero las áreas corresponden a las homónimas numeradas en las redes globales que se recogen en el anexo 7.

Adicionalmente entre los genes positivos aparecen enzimas relacionadas con la biogénesis de ribosomas (PES1, RRP1 y 1B, BMS1, EBNA1BP2), con la inactivación del p-53 (NOC2L) y enzimas de la glicólisis (PFKP, HK3 y GPI), representados en las áreas 3 y 4 de la figura 20, respectivamente.

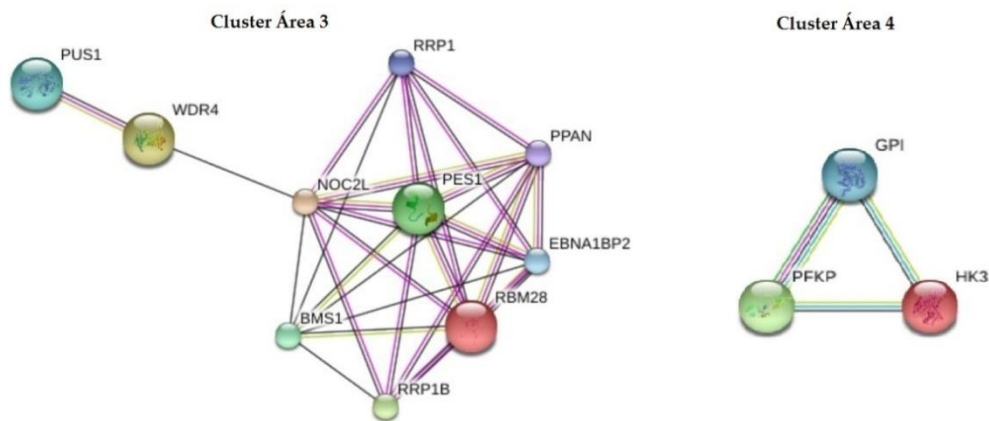


Fig. 20. Área 3: enzimas relacionadas con la biogénesis de ribosomas (proteínas enlazadas: 10; interacciones encontradas: 29; interacciones esperadas: 0; *p-value*: 0). Área 4: enzimas de la glicólisis (proteínas enlazadas: 3; interacciones encontradas: 3; interacciones esperadas: 0; *p-value*: 3.69×10^{-6}).

Entre las asociaciones proteicas más relevantes por el número de interacciones observadas a partir de los genes con correlación negativa con el SUV se encuentran las representadas en el *cluster* de la figura 21, que corresponden con enzimas asociadas con la adhesión celular y la reorganización del citoesqueleto (MAPK3, RHOC, RHOA, RAC, MYL, ACTB, entre otras).

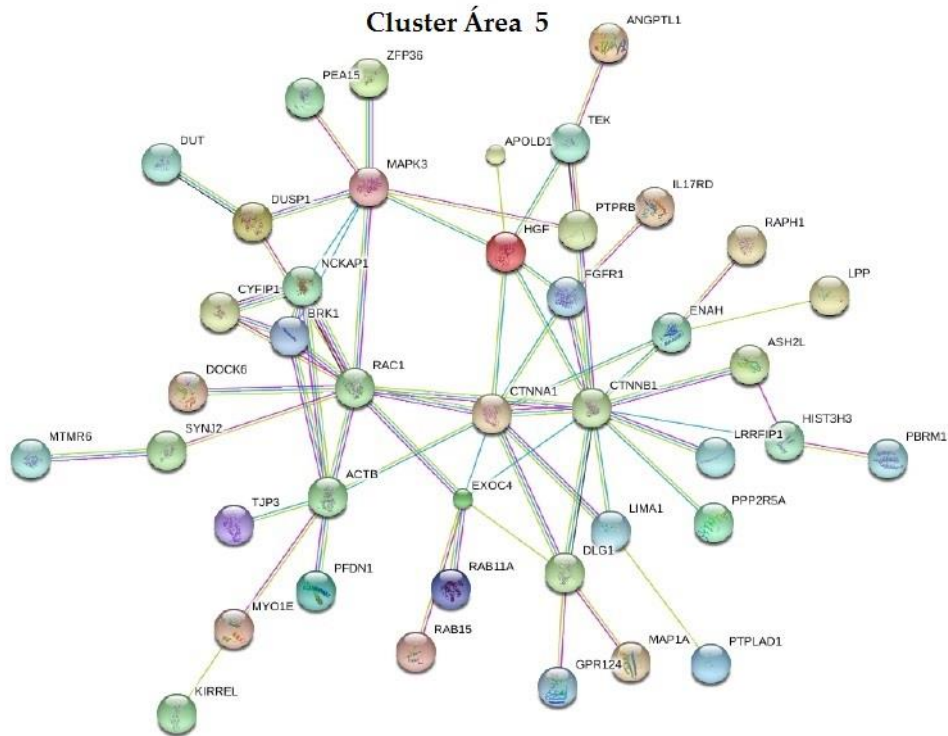


Fig 21. Mapa de interacción de proteínas de adhesión y citoesqueleto del *cluster* con mayor número de proteínas entre los genes que se asocian negativamente con el SUV (proteínas enlazadas: 42; interacciones encontradas: 64; interacciones esperadas: 8; *p-value*: 0).

En la figura 22, se muestran en el área 6 el *cluster* que comprende proteínas ribosómicas (RPL) y de finalización de la translación (ETF), y en el área 7 un *cluster* con enzimas involucradas en procesos autofágicos (ATG5 y 7, ULK2 y SQSTM1), de formación de vesículas endosómicas (CHMP2B) y anti-apoptóticos (BAG3).

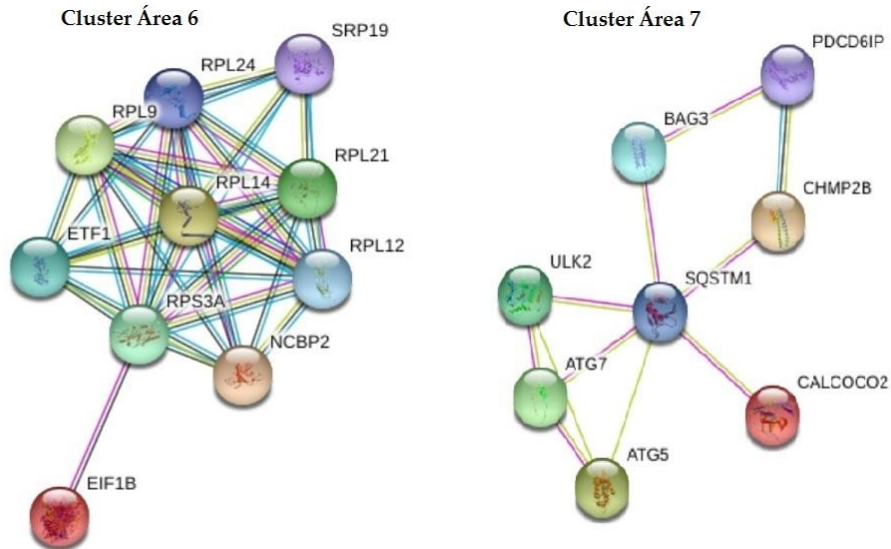


Fig. 22. Área 6: proteínas ribosomales y de finalización de la translación proteica (proteínas enlazadas: 10; interacciones encontradas: 35; interacciones esperadas: 2; *p-value*: 0). Área 7: enzimas relacionados con procesos de autofagia (proteínas enlazadas: 8; interacciones encontradas: 11; interacciones esperadas: 0; *p-value*: 0).

Adicionalmente se efectuó un ssGSEA usando las firmas obtenidas de la *Molecular Signatures Database* v5.1 para cada microarray de los 71 pacientes del *training set*, y se correlacionaron de manera pareada con el SUV transformado de cada paciente. En el anexo 8 se muestran las *Canonical Pathways* más significativas obtenidas mediante la aplicación del ssGSEA y su coeficiente de correlación respecto del SUV, para una significación $p \leq 0.05$. Podemos destacar entre ellas por su significación las vías involucradas en la motilidad, adhesión celular y formación de neovasos, todas ellas correlacionadas negativamente con el SUV, como son: *vascular smooth_muscle_contraction* (CR:-0.3827), *st_integrin_signaling_pathway* (CR:-0.3382), *pid_endothelin_pathway* (CR:-0.3101), *pid_ncadherin_pathway* (CR:-0.2782), *biocarta_integrin_pathway* (CR:-0.2759), *reactome_smooth_muscle_contraction* (CR:-0.274), *biocarta_myosin_pathway* (CR:-0.2689), *kegg_regulation_of_actin_cytoskeleton* (CR:-0.269) y *pid_lymph_angiogenesis_pathway* (CR:-0.2505). Las vías de señalización C-MYC se correlacionan positivamente con el SUV si están activadas, o negativamente en caso de inactivación de las mismas: *dang_regulated_by_myc_up*

(CR: 0.2839), *coller_myc_targets_down* (CR: -0.274) y *dang_myc_targets_up* (CR: 0.2436). También son reseñables las vías de señalización tumoral mTor, PI3K, RAS, MET y PTEN, con correlación negativa: *biocarta_pten_pathway* (CR: -0.3956), *reactome_pi3k_events* (CR: -0.3232), *kegg_mtor_signaling_pathway* (CR: -0.2888), *biocarta_ras_pathway* (CR: -0.2692) y *biocarta_met_pathway* (CR: -0.2506). Por último mencionar las relacionadas con la glicólisis, como: *cui_glucose_deprivation* (CR: 0.2766), *reactoma_facilitative_na_independent_glucose_transporters* (CR: 0.2496) y *biocarta_insuline_pathway* (CR: -0.2373).

4.5 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO PREDICTIVO

Con el panel de genes seleccionados se ajustaron en los datos del *training set* dos modelos lineales de regresión: PLS y PCR, y dos no lineales: RF y SVM tal como se explicó en el apartado 3, y se estimó la eficiencia de cada uno de los 4 modelos seleccionados en el *cross-validation set*. Las métricas usadas para estimar la eficiencia de los modelos fueron el RMSE, que hace relación al error medio cometido en la estimación de la respuesta (el SUV) predicha por el modelo en relación con la observada en un determinado *dataset*, y el R², que hace relación al porcentaje de la varianza total que explica un modelo. También se estimaron los mejores parámetros de cada modelo para encontrar aquellos que optimizaban la eficiencia en datos no vistos.

En la tabla XI se muestran los valores medios, desviación estandar (SD) y el intervalo de confianza del 95% de las métricas obtenidas de los 50 distintos modelos ajustados tras *10-fold CVx5*.

Tabla XI. Medias y desviaciones standard para cada modelo de RMSE y R².

Modelos	R ²	SD	CI95%	RMSE	SD	CI95%
PLS	0.567	±0.234	(0.035 - 0.886)	0.443	±0.119	(0.257 - 0.662)
PCR	0.576	±0.228	(0.072 - 0.891)	0.431	±0.111	(0.228 - 0.611)
RF	0.461	±0.273	(0.043 - 0.873)	0.526	±0.120	(0.337 - 0.719)
SVM	0.501	±0.260	(0.037 - 0.895)	0.476	±0.128	(0.274 - 0.659)

En ellos se observa que tanto el PLS como el PCR son similares y más favorables (menor RMSE y mayor R²) que el resto de modelos.

Para poder comparar los modelos se calcularon las diferencias entre el RMSE y R^2 mediante T-test o test de Wilcoxon (ambos con 49 grados de libertad y ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples) respectivamente (tabla XII).

Tabla XII. Diferencias RMSE y R^2 entre los distintos modelos.

Modelos	RMSE (<i>p-value</i>)	R^2 (<i>p-value</i>)
PLS vs PCR	0.08936	0.3108
PLS vs RF	$5.3 \cdot 10^{-7}$	0.01667
PLS vs SVM	0.0002238	0.000962
PCR vs RF	$2.087 \cdot 10^{-11}$	$5.925 \cdot 10^{-5}$
PCR vs SVM	$2.198 \cdot 10^{-7}$	0.001221
RF vs SVM	$5.05 \cdot 10^{-6}$	0.2839

Dada la semejanza de comportamiento entre las dos métricas (RMSE y R^2) usadas para las distintas comparaciones y selección de parámetros de los modelos estudiados, se consideró más conveniente seleccionar únicamente el RMSE a partir de este momento, ya que como se ha mencionado previamente, se considera el parámetro de comparación más intuitivo y el más usado en la literatura. Como se puede ver únicamente hay dos modelos, el PLS y el PCR, que no muestran diferencias significativas en la diferencia de medias de RMSE calculada entre ellos y que sí muestran diferencias significativas de cada uno de estos dos modelos con el resto. De forma ilustrativa se representa la mejor capacidad de predicción de estos dos modelos en el gráfico que aparece en la figura 23, donde se muestran las diferencias en el RMSE con un intervalo de confianza del 0.992 ajustado, encontrándose mejor posicionado respecto al valor central 0,00.

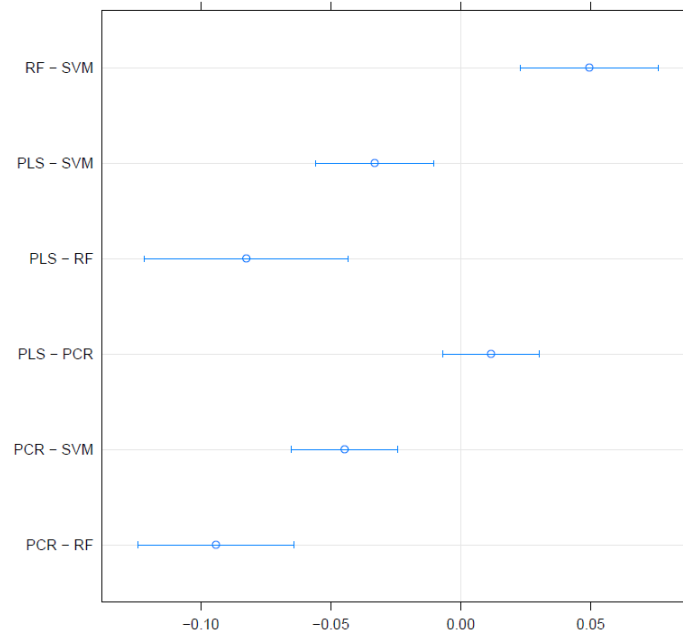


Fig. 23. Representación gráfica de las diferencias de RMSE con un intervalo de confianza del 0.992.

En la decisión final del modelo predictivo a elegir, además del error observado (y por un principio estadístico de parsimonia) hay que tener en cuenta el número de componentes necesarios para alcanzar el mejor ajuste. A continuación se muestran las gráficas de ajuste del modelo de regresión PLS (figura 24) y del modelo de regresión PCR (figura 25), en función de los componentes utilizados y el punto en el que se alcance el mejor ajuste, que corresponde con el error mínimo. En ellos se demuestra, tal como se mencionó en el apartado 3.3.3, que este error mínimo se alcanza en el PLS con 3 componentes (PLS-3), mientras que se requieren 18 componentes para el mismo ajuste con el PCR. La mayor simplicidad a la hora de realizar los siguientes análisis utilizando un modelo estadístico que requiera únicamente 3 componentes nos hizo elegir el modelo de regresión PLS para su desarrollo en este trabajo.

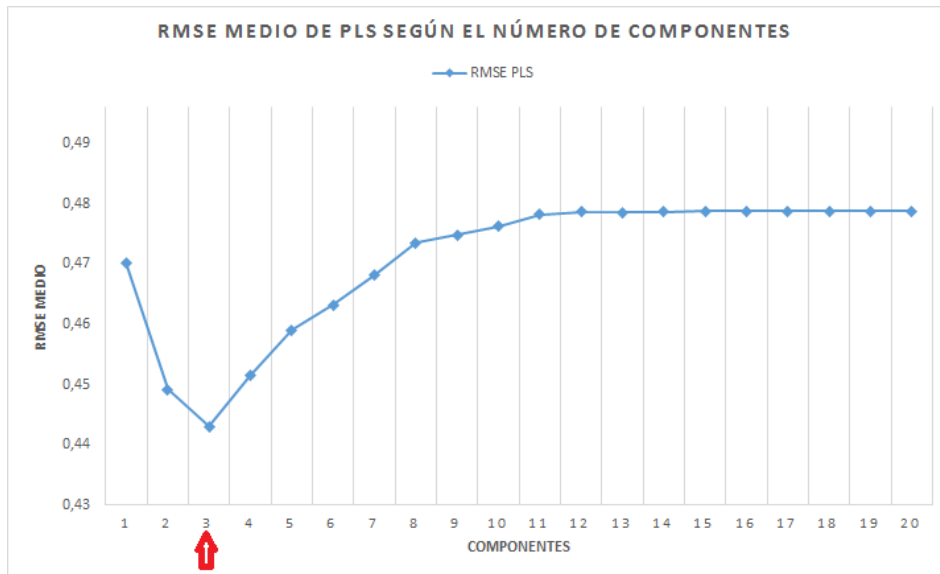


Fig. 24. Representación gráfica del error mínimo para PLS estimado mediante *10-fold* CVx5.

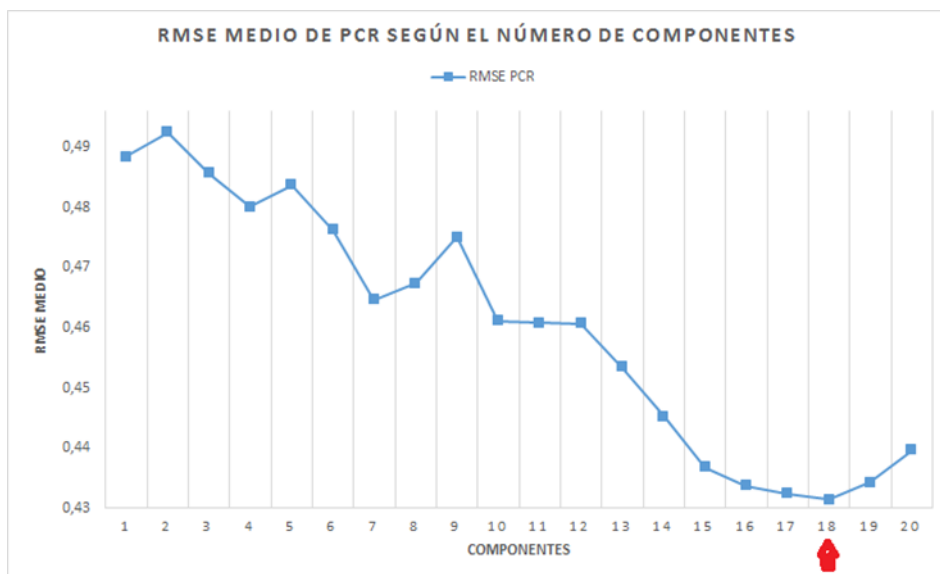


Fig. 25. Representación gráfica del error mínimo para PCR estimado mediante *10-fold* CVx5.

Una vez seleccionado PLS-3 como modelo para predicción del SUV con un RMSE medio de 0.443 (ver tabla XI) se procedió a comprobar la bondad del ajuste de este modelo en el *cross-validation set*, para lo cual se representaron gráficamente

las predicciones de SUV de la *10-fold CV* contra los datos observados (figura 26), observándose un buen ajuste del modelo PLS-3.

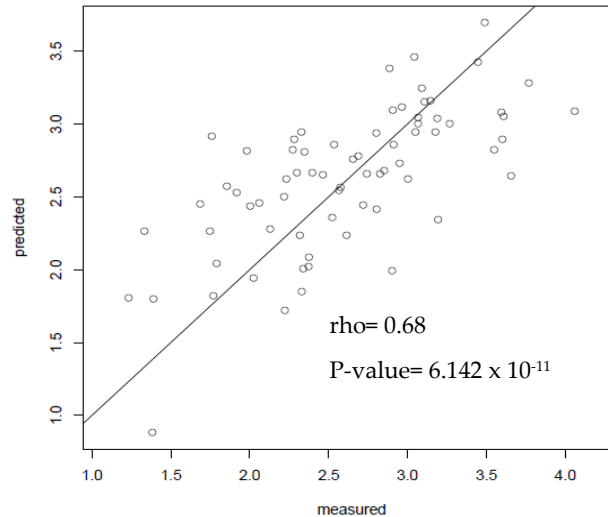


Fig. 26. Representación gráfica de las predicciones de SUV del PLS-3 contra los datos observados en la primera *10-fold CV*.

El coeficiente de correlación de Pearson del valor medio de las predicciones de las 5 repeticiones de la *10-fold CV* en el PLS-3, contra el valor de SUV observado, fue semejante al de la figura 26 ($\rho=0.69$, $p=2.693 \times 10^{-11}$). En el modelo PLS se consideran separadamente por cada componente la varianza de la respuesta (en este caso del SUV) y la de los datos de los predictores (las sondas seleccionadas). El porcentaje de la varianza del SUV explicado con el tercer componente del modelo PLS fue superior al 89%.

Tras esta primera comprobación se ajustó el PLS-3 a todos los datos del *training set*, ya que este ajuste a los 71 casos sería el usado para evaluar la eficiencia del modelo en el *validation set* (figura 27).

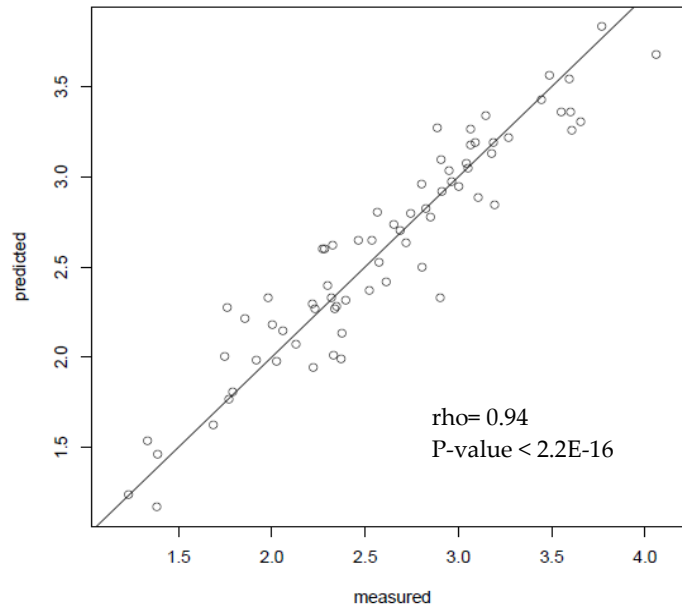


Fig. 27. Resultados del ajuste del modelo PLS de 3 componentes a los datos del *training set*.

Como era de esperar el ajuste del modelo PLS al *training set* fue mejor que el de la *10-fold CV*, aunque el comportamiento del modelo en datos independientes es más probable y realista que se parezca al estimado de la figura 26. Además, para acabar de demostrar si el ajuste del modelo PLS era óptimo, se hizo otra comprobación gráfica dibujando el *plot* de los residuales del modelo PLS de 3 componentes ajustado a los 71 pacientes del *training set* (figura 28). En el gráfico de la figura 28 se puede apreciar cómo no se distingue ningún patrón particular en la distribución de los residuales y que se distribuyen bastante aleatoria y homogéneamente, por lo que se concluye que el ajuste del PLS-3 al *training set* es óptimo.

Para tratar de ganar un mayor entendimiento del significado biológico que puede aportar este modelo PLS de 3 componentes ajustado a los datos del *training set* se estudió la sobrerrepresentación estadística de los genes que presentaron una mayor contribución estadística (*loading weight*) en este tercer componente.

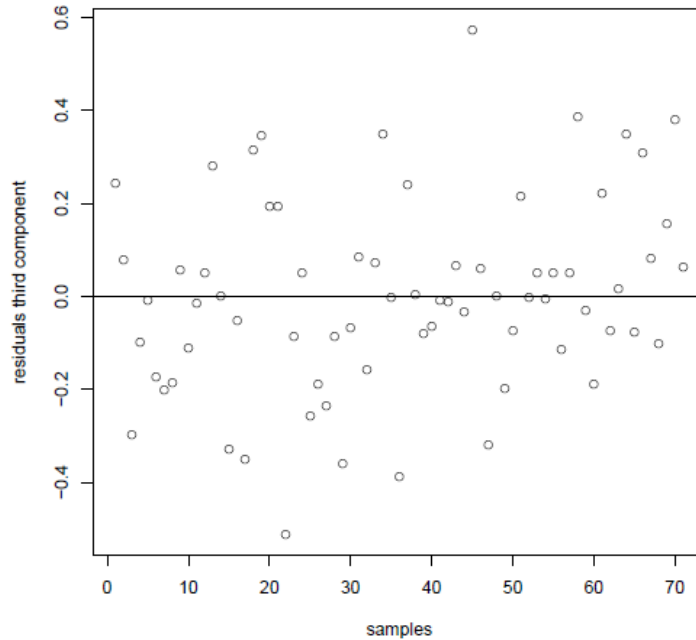


Fig. 28. *Plot* de los residuales del modelo PLS de 3 componentes ajustado al *training set*.

En las tablas XIII y XIV se recogen los procesos biológicos más relevantes por su contribución positiva o negativa según aparecen recogidos en *David Database*. La orientación de los procesos biológicos asociados negativamente con la variación del SUV señala como relevantes fenómenos como la adhesión celular, la organización del citoesqueleto, la regulación de la motilidad celular y la angiogénesis. Los genes de mayor peso para la contribución positiva a la variabilidad del SUV, tal y como ya se recogía en la tabla VIII de los genes de mayor correlación positiva, corresponde a la biogénesis de ribosomas, que aparece en primer lugar, y a la biosíntesis de proteínas. Además es destacable el papel que cobran los genes de regulación del transporte y la metabolización de la glucosa. Por ejemplo, el proceso biológico de importación de la glucosa aparece en el 3^{er} lugar y el de regulación de su transporte en 5^o, dando a entender que el tercer componente del modelo PLS ajustado a estos datos recoge las direcciones de varianza relacionadas con procesos biológicos muy relevantes para la captación de FDG y sus consecuencias potenciales en tumores metastásicos.

Tabla XIII. Top 10 procesos biológicos relacionados con los *loading weights* de los genes más positivamente correlacionados con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0042273~ribosomal large subunit biogenesis	1,19	0,006	1,000
GO:0051050~positive regulation of transport	3,56	0,007	0,991
GO:0046324~regulation of glucose import	15,81	0,008	0,975
GO:0006414~translational elongation	2,37	0,008	0,950
GO:0010827~regulation of glucose transport	15,81	0,008	0,910
GO:0005979~regulation of glycogen biosynthetic process	1,19	0,013	0,950
GO:0010962~regulation of glucan biosynthetic process	1,19	0,013	0,950
GO:0032885~regulation of polysaccharide biosynthetic process	1,19	0,013	0,950
GO:0032881~regulation of polysaccharide metabolic process	1,19	0,014	0,947
GO:0032268~regulation of cellular protein metabolic process	5,14	0,015	0,933

Tabla XIV. Top 10 procesos biológicos relacionados con los *loading weights* de los genes más negativamente correlacionados con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0007155~cell adhesion	9.2	1.34E+11	0.022
GO:0022610~biological adhesion	9.2	1.35E+11	0.011
GO:0007160~cell-matrix adhesion	3.1	2.43E+11	0.013
GO:0031589~cell-substrate adhesion	3.1	5.25E+10	0.021
GO:0030029~actin filament-based process	4.6	8.63E+10	0.028
GO:0030036~actin cytoskeleton organization	4.3	1.70E+12	0.046
GO:0051270~regulation of cell motion	36.8	5.81E+11	0.128
GO:0030334~regulation of cell migration	3.4	7.69E+11	0.147
GO:0001525~angiogenesis	3.1	0.001	0.191
GO:0040012~regulation of locomotion	3.4	0.002	0.283

4.6 VALIDACIÓN EXTERNA DEL MODELO PREDICTIVO

Para la validación del modelo se incluyeron en un principio 14 pacientes, que no formaban parte de los primeros 71 analizados y por tanto cuyos datos no habían sido utilizados en la confección del mismo. En la serie de validación, *validation set*,

a diferencia de la muestra previa en la que todas las lesiones analizadas fueron metástasis, se incluyeron dos tumores primarios localmente avanzados, que correspondían a un paciente con adenocarcinoma de páncreas y otro con un tumor de vías biliares. El listado completo de la serie de los 14 pacientes, mostrando la distribución de frecuencias por histología del tumor primario y la localización de la lesión biopsiada para la realización del microarray, se muestra en la tabla XV.

Tabla XV. Datos histológicos, de localización de la biopsia y cuantificación del *validation set*. * *Outlier*

Histología (n=14)	Localización Biopsias	MTV (cm ³)	SUV _{max}	SUV _{med35}
Ca. Esófago	Adenopatía	86	42,14	23,62*
Ca. Vías Biliares	Primario	843	18,99	10,74
Ca. Ovario	Implante Retroperitoneal	283	21,66	9,95
Ca. Ovario	Implante Retroperitoneal	267	19,54	8,83
Ca. de Mama	Adenopatía	5	14,61	8,62
Ca. Renal	Adenopatía	18	15,49	8,36
Ca. Páncreas	Hígado	1009	17,14	8,02
Ca. Ovario	Implante Retroperitoneal	31	11,55	6,87
Ca. Páncreas	Primario	19	9,16	5,18
Ca. de Mama	Adenopatía	2	8,81	4,93
Ca. Pulmón	Pulmón	78	8,3	4,09
Ca. Gástrico	Implante Retroperitoneal	5	5,23	3,96
Ca. Vías Biliares	Implante Retroperitoneal	5	6,88	3,38
Ca. del Tracto Genitourinario	Adenopatía	6	2,66	1,96

Se calculó el SUV_{med35} de cada paciente, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la serie inicial, el SUV medio del VOI de isocontorno semi-automático con un umbral del 35% del SUV_{max}. En esta nueva serie, un paciente presentó un SUV_{med35} de 23.62, anormalmente alto y muy por encima del valor máximo incluido en la serie inicial (el máximo SUV_{med35} inicial fue 16.69 y la media 6.71),

considerándose por ello un *outlier* y excluido del *validation set* para siguientes análisis. El valor inferior correspondió a una lesión de SUV_{med35} 1.96, que se encontraba por debajo del valor mínimo de la serie inicial (mínimo SUV_{med35} 2.35), y que inicialmente no fue considerado como un *outlier*, permaneciendo incluido en el *validation set* (n=13). En la figura 29 se muestra la cuantificación de esta lesión, que corresponde a una metástasis ganglionar axilar de un adenocarcinoma de endometrio.

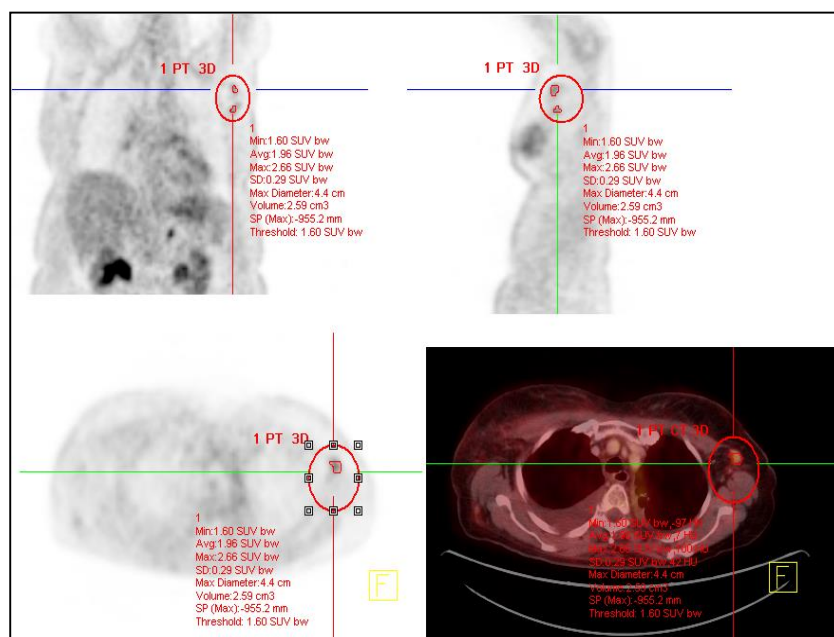


Fig. 29. Adenopatía axilar de SUV_{med35} 1.96.

En estos nuevos 13 microarrays se repitieron los procedimientos iniciales en el procesamiento y obtención de datos de intensidad del canal Cy5. Con estos datos, no previamente vistos por el modelo predictivo, se obtuvieron los datos de SUV predichos para cada paciente. En la tabla XVI se recogen los valores de SUV obtenidos mediante la imagen PET (SUV_{PET}) y el SUV_{med35} estimado mediante el uso del modelo predictivo (SUV_{PLS}), para cada paciente.

Una vez obtenidos los valores de SUV estimados y reales se calculó el RMSE del *validation set* (PLS1) que fue de 0.645. Éste se encuentra comprendido dentro del

intervalo de confianza del 95% estimado en el modelo inicial mediante *10-fold CVx5* (RMSE entre 0.257 y 0.662).

Tabla XVI. Resultados de predicción del SUV a partir del modelo y su comparación con el dato obtenido de la imagen PET.

N=13	SUV_{PET}	SUV_{PLS}
Paciente 1	4,09	6,02
Paciente 2	8,36	5,40
Paciente 3	5,18	3,45
Paciente 4	10,74	6,11
Paciente 5	8,62	7,30
Paciente 6	8,02	7,92
Paciente 7	6,87	6,18
Paciente 8	4,93	6,90
Paciente 9	1,96	6,43
Paciente 10	8,83	7,76
Paciente 11	3,96	4,13
Paciente 12	3,38	4,60
Paciente 13	9,95	7,30

Adicionalmente se calculó el RMSE excluyendo el paciente cuyo SUV quedaba por debajo del valor mínimo de la serie inicial, ya que la desviación mostrada en la predicción (SUV_{PET}= 1,96 vs SUV_{PLS}= 6,43) lo catalogaba como un *influential observation*. El RMSE calculado excluyendo este valor fue de 0.454, y mostrando un ajuste equivalente al del valor medio del modelo inicial estimado en el *cross-validation set* (0.443).

4.7 EFECTOS DE LA DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE SONDAS EN LA EFICIENCIA DEL MODELO PREDICTIVO

Una vez demostrada la capacidad predictiva del modelo PLS-3 con 909 sondas, se planteó la posibilidad de obtener resultados semejantes (o incluso mejores) utilizando únicamente las sondas que se asociaban positivamente con el SUV, suprimiendo cerca de 600 que se correlacionaban negativamente con éste.

Para ello se estudió el RMSE obtenido tras *10-fold CV* simple en el *training set* ($n=71$) usando firmas con número de sondas reducidas, tal y como se ha explicado en el apartado de métodos. En las figuras 30 y 31 se muestran el RMSE y el porcentaje de la varianza del SUV respectivamente, explicados de acuerdo al número de sondas empleado.

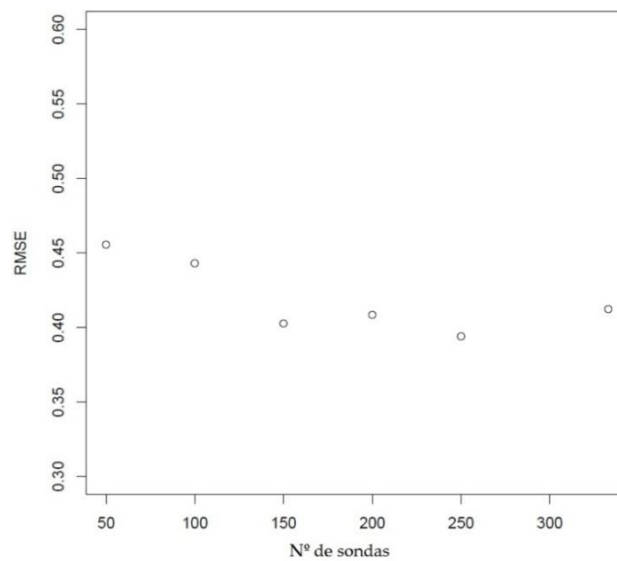


Fig. 30. Muestra el RMSE de acuerdo al número de sondas empleado con PLS-3.

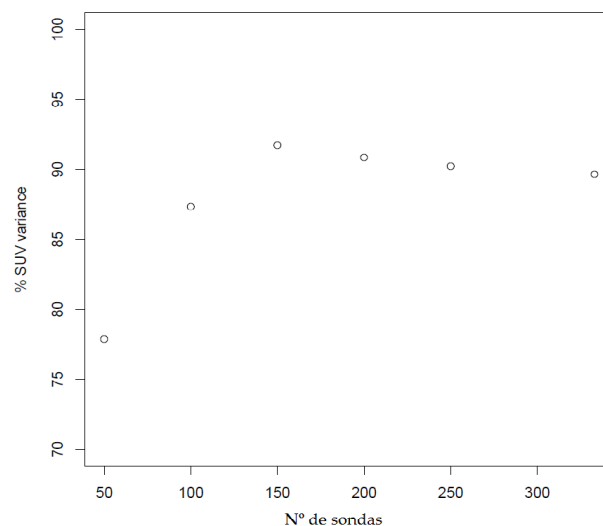


Fig. 31. Muestran el porcentaje de la varianza del SUV de acuerdo al número de sondas empleado con PLS-3.

El uso de la firma con mayor número de sondas tiene un RSME de 0.45, y aparentemente, los menores RMSE corresponden a la firma de 249 sondas (0.3937) y a la de 149 sondas (0.4026). Estos valores de RMSE son inferiores al promedio de los obtenidos con la firma de 909 sondas (0.443). Debido a estas diferencias probamos las dos mejores firmas reducidas (149 y 249) en nuestro *validation set* con PLS-3. Sin embargo, el RMSE para las firmas reducidas fue superior al RMSE de la firma de 909 sondas, tal y como se recoge en la tabla XVII.

Tabla XVII. Valores de RMSE para la firma completa y reducidas en el *validation set*.

Firma	PLS3-909s	PLS3-149s	PLS3-249s
RMSE	0.645	0.736	0.703

Deducimos de estos resultados que, el intento de disminuir la varianza de las firmas con números de sondas reducidos, en el *training set* conlleva un aumento del sesgo y peores resultados en el *validation set* que las de la firma original de 909 sondas. Además, se deduce que los genes correlacionados de manera negativa con el SUV son relevantes para una mejor eficiencia de la firma en el *validation set* independiente, disminuyéndose el sesgo.

Podemos concluir que con estas 909 sondas se ha podido confeccionar una firma genómica que predice la actividad metabólica de tumores de distintos subtipos histológicos, en concreto el SUV_{med35} , no pudiéndose conseguir una reducción del número de las mismas sin comprometer la bonanza de la predicción, y siendo relevante la contribución de las sondas que se correlacionan negativamente con el SUV. Además se demuestra que el modelo que ha presenta una mejor capacidad predictiva para el SUV en nuestra serie es el PLS de 3 componentes, en comparación con métodos de probada eficacia en otras situaciones tales como RF y SVM.

5. DISCUSIÓN

5.1 PACIENTES DEL *TRAINING SET* Y *VALIDATION SET*

La serie de pacientes aquí seleccionada constituye una muestra representativa de los tumores poblacionales más frecuentes y se considera que esta diversidad aporta una información valiosa sobre los elementos genéticos comunes de las células tumorales metastásicas de distintas procedencias histológicas, en su relación de dependencia del metabolismo de la glucosa inferido a través de la captación de FDG. Como ya se ha comentado en el apartado 3 se incluyeron en este trabajo pacientes a los que se realizó un PET/CT basal con FDG para determinar respuesta metabólica precoz al tratamiento y un MAGE para orientar la terapia, constituyéndose dos grupos: el *training set* (n=71) y el *validation set* (n=13). Dos de las firmas de FDG que encontramos en la literatura sin embargo parten de poblaciones con tumores primarios, están limitadas a una histología (cáncer no microcítico de pulmón y cáncer de mama) y presentan series de pacientes más cortas [149,150,151].

En el *training set* todos los pacientes presentaban metástasis, sin embargo en *validation set* se incluyeron dos pacientes con tumores primarios avanzados, un adenocarcinoma de páncreas y un tumor de vías biliares, confirmándose a pesar de ello la capacidad de predicción del modelo, como se comentará en detalle más adelante. A pesar de ello se ha considerado adecuada la utilización de ambas poblaciones como *training* y *validation sets* para la construcción y validación externa del modelo predictivo, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras para ninguno de los datos poblacionales recogidos o de cuantificación analizados.

Por lo todo lo comentado anteriormente consideramos que ésta es una serie válida y representativa que nos permitiría la elaboración de una firma genómica que identificara adecuadamente los genes comunes que correlacionan mejor con la captación de FDG en un grupo heterogéneo de tumores metastásicos, y que podría aportar una información relevante para comprender mejor los elementos comunes en el metabolismo energético tumoral.

5.2 CUANTIFICACIÓN FDG PET/CT

El PET/CT con FDG ha demostrado su utilidad como biomarcador de imagen cualificado de respuesta a la quimioterapia y a la radioterapia, tanto en clínica como en investigación [50,79-81]. Además, se ha comprobado en gran número de estudios como la separación entre respondedores y no respondedores en función del PET/CT tiene significación pronóstica [62,64,68-76,78] y su uso repercute favorablemente en la reducción de toxicidad y de los costes asociados al tratamiento [78,83,84].

Sin embargo, su papel en la valoración de la respuesta precoz está más en cuestión y requiere de la estandarización de procedimientos y de una cuantificación de la imagen metabólica precisa y reproducible [53-60,73]. Los valores de cuantificación de PET/CT más ampliamente utilizados para la valoración precoz de la respuesta tumoral son el SUV máximo o medio, más excepcionalmente el SUV pico [36,37,39,79] y más recientemente el MTV y el TLG [40-43].

En la cuantificación de las imágenes PET/CT del presente estudio no se ha pretendido establecer un estudio comparativo al uso entre las distintas medidas de cuantificación realizadas para establecer la más óptima en esta indicación, sino que se ha seleccionado entre los parámetros disponibles una medida robusta, reproducible y que fuera representativa de los fenómenos biológicos que subyacen a la captación de FDG. Para ello se han obtenido aquellos parámetros de cuantificación disponibles y sus correcciones consideradas como habituales en esta indicación (SUV_{max} , SUL, SUV_{glu} , el MTV y el TLG y el T/N). Además se ha incluido una optimización del SUV medio, el SUV_{med35} , obtenido de trabajos previos de nuestro grupo como ya se ha comentado en el apartado 3.2.

En la selección del parámetro de cuantificación más adecuado para correlacionar con los datos del array se valoró el comportamiento poblacional de los datos obtenidos, eligiéndose el SUV_{med35} , el SUV_{max} y el SUL por ser los que se ajustaban a estas características deseables en la elaboración del modelo predictivo, la linealidad y su ajuste a una distribución normal. Por otro lado, la utilización del SUV_{max} , del SUV_{med35} o del SUL (que es una corrección por el índice de masa corporal del SUV_{med35} en nuestro caso), está en consonancia con los valores de consenso establecidos en la literatura para la valoración de la respuesta antitumoral

[32,77]. Además, de forma semejante a lo descrito por otros autores [151], podríamos considerar la información proporcionada por estos tres parámetros redundante ya que en nuestro caso presentaron una alta correlación entre sí ($r > 0.9$), considerándose pues equivalentes tanto para la confección de la firma, como en la interpretación de los fenómenos biológicos subyacentes.

Entre estos los tres parámetros de cuantificación anteriormente mencionados, equivalentes desde un punto de vista estadístico en la construcción del modelo, se ha considerado más adecuado la selección del SUV_{med35} por la menor incertidumbre intrínseca asociada a su cálculo y su mayor reproducibilidad inter e intra-observador [77,137]. Además su selección está en consonancia con los autores que recomiendan el uso del SUV medio frente al SUV máximo en la cuantificación de los efectos biológicos en la respuesta tumoral [77,136-138].

5.3 AGRUPACIÓN JERÁRQUICA

La selección de los genes para la confección del modelo predictivo se realizó en función de su mayor correlación con el SUV (aquellas sondas cuyo coeficiente de regresión univariada tenía un umbral de ± 1), enfrentando cada uno de los resultados del microarray de cada paciente con el valor del SUV obtenido en la imagen PET/CT. En la aglomeración jerarquizada y no supervisada del *training set* representada en el *heatmap* de la figura 17, se observa como con esta selección de 909 sondas se ha logrado una adecuada discriminación de los pacientes en 5 *clusters*. El patrón de expresión identificado agrupaba a los pacientes únicamente en relación al SUV (con medias de SUV estadísticamente diferentes) y no en función de otros datos clínico-patológicos como el diagnóstico histológico o la localización de la biopsia, que se encontraron similarmente distribuidos entre los diferentes *clusters*.

También se ha demostrado que este agrupamiento usando los genes que mejor correlacionaban con el SUV, no separaba a los pacientes por su significación pronóstica. Para ello se aplicó esta agrupación a una serie pública extensa de cánceres primarios de mama con datos de supervivencia libre de metástasis, y se comprobó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas tras el análisis multivariante que incluía los factores de riesgo más establecidos. Esto es consistente con los datos recogidos en la literatura donde la asociación entre el

pronóstico y la firma confeccionada de FDG no ha podido demostrarse fehacientemente, como se discutirá más adelante [149,151].

5.4 PROCESOS BIOLÓGICOS RELEVANTES

Los mecanismos celulares y moleculares que determinan la captación de FDG por parte de los tumores siguen siendo poco conocidos, y consideramos que los resultados expuestos correspondientes a este apartado constituyen la mayor aportación del presente trabajo.

Como se ha comentado en la introducción, la mayoría de los estudios que han correlacionado grado de captación de FDG y expresión génica son estudios preclínicos realizados sobre líneas celulares tumorales o en muestras reducidas de pacientes de un solo tipo histológico tumoral y estableciendo a priori un número seleccionado de genes a analizar [85-114]. A diferencia de estos estudios, los datos recogidos en el presente trabajo se han obtenido en una serie más amplia de pacientes y con tumores metastásicos de diversas histologías representativas de los tumores más frecuentes. Además en este estudio no se ha realizado una selección previa de los genes a estudiar, sino que se ha utilizado un método estadístico semi-supervisado sobre un amplio panel de genes, que contenía la mayor parte de los recogidos en la literatura. En la tabla XVIII se muestran los coeficientes de regresión hallados extraídos de nuestro datos para aquellos genes referidos previamente en la literatura para los que se ha encontrado equivalente en nuestro microarray. Para aquellos genes representados por más de una sonda se ha seleccionado el coeficiente de regresión mayor para los valores positivos o el menor en el caso de los negativos.

Tal y como cabría esperar (y se recoge en la tabla XVIII), las sondas asociadas a genes individuales involucrados con el transporte y metabolismo de la glucosa se correlacionan positivamente con el SUV (Glut 1 y 3, LDH, G6PD y HK2). Estos datos están en consonancia con los resultados publicados en la literatura, como era a priori esperable, que muestran asociaciones estadísticamente significativas positivas entre los genes involucrados en el transporte y metabolismo de la glucosa con la intensidad de captación de FDG. En concreto la mayoría de autores han explorado la asociación entre la captación de FDG con la expresión de las principales enzimas relacionadas con la glicólisis: HK1-2, PFK1-2, GLUT 1-4 y

LDHA [85,88-114] y con la activación de vías oncogénicas como: KRAS, p53, cMyc, AMPK/mTOR, PI3K-Akt, ERB2-neu o del HIF1 α , mostrando resultados diferentes en función del grado de diferenciación [103-106].

Tabla XVIII. Coeficientes de regresión (CR) respecto del SUV de genes estudiados en la literatura y para los que se ha encontrado equivalente en el microarray utilizado en este trabajo.

GENES LITERATURA	Nomen.	Papel metabólico	CR vs SUV	Referencias
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	G6PD	Metabolismo glucosa	0,925	106
NFKB2	NFKB2	Factor nuclear proinflamación	0,922	102
AKT2	AKT2	vía PI3K/AKT	0,859	101
KRAS	KRAS	Vías de señalización tumoral	0,781	104
VEGFA	VEGFA	Angiogénesis	0,770	88
Glut 1	SLC2A1	Transportador membrana celular Glucosa 1	0,758	85,88,89,91-99,101,104,105,107,109-114
Lactato deshidrogenasa (LDHA)	LDHA	Actividad oxidoreductasa	0,745	98,99,101,102
Hexoquinasa 2 (HK2)	HK2	Metabolismo glucosa	0,622	88,91,93,97-101,103,106,107,110,111
AKT1	AKT1	vía PI3K/AKT	0,620	101,103
PFKFB3	PFKFB3	Metabolismo glucosa	0,570	103
Glut 3	SLC2A3	Transportador membrana celular Glucosa 3	0,565	90,95,110,111,113,114
PIK3CA	PIK3CA	vía PI3K/AKT	0,270	101,103
P53	TP53	Vías de señalización tumoral	-0,015	106
ANGPT2	ANGPT2	Angiogénesis	-0,170	88
Ki-67	MKI67	Proliferación celular	-0,172	111,112
PTEN	PTEN	Vías de señalización tumoral	-0,188	105
C-MYC	MYC	Vías de señalización tumoral	-0,199	103
HIF-1alfa	HIF1A	Factor inducible de hipoxia	-0,216	88,103,104,107,109
Glicoproteína P	ABC1	Transportador	-0,242	162
ESR1	ESR1	Receptor estrógeno	-0,541	85
AKT3	AKT3	vía PI3K/AKT	-0,697	101,103
SLC2A8	SLC2A8	Facilitador del transporte transmembrana	-0,957	85
Wnt1	WNT1	Vías de señalización tumoral	Dato Filtrado	103

En relación con las enzimas de la glicólisis se han descrito cuatro HK fundamentales, codificadas por diferentes genes. La célula tumoral facilita el primer paso del metabolismo de la glucosa induciendo la expresión de HK2 y HK1, que también se expresa en células normales. En el presente trabajo, la HK3 es la que ha mostrado un más elevado coeficiente de regresión con el SUV, mientras que en la literatura esta asociación positiva se haya establecido preferentemente para HK2 [88,91,93,97-101,103,106,107,110,111], que en el presente estudio mostraba un CR inferior (HK3 CR: 1.54 vs HK2 CR: 0.622). Sin embargo, el papel de la HK3 en el metabolismo tumoral no está aún bien esclarecido. HK3 es la enzima que presenta una mayor afinidad por la glucosa de las tres, pero se encuentra inhibida cuando la glucosa se encuentra en sus niveles fisiológicos [13]. Podríamos encontrar una explicación a nuestros resultados planteando una posible activación de la HK3 en condiciones de un microambiente tumoral con deprivación local de glucosa que confiriera a esta HK una mayor contribución al SUV.

De todas formas es muy consistente la correlación entre el SUV y las distintas enzimas de la glicólisis como se ha demostrado en este estudio. Las recientes evidencias, que apuntan hacia el papel capital del efecto Warburg en la carcinogénesis y la posibilidad de su bloqueo como novedosa diana terapéutica [5,8,13], ofrece interesantes posibilidades de futuro para explorar el uso de la imagen PET/CT en esta nueva indicación: permitir una valoración *in vivo* de la activación de las vías claves de la glicólisis y por tanto la indicación de una novedosa terapia anti-tumoral cuando estén disponibles.

Respecto a las vías de señalización tumoral, llama la atención la correlación negativa observada con PTEN (CR:-0.188), con p53 (CR: -0.015), con HIF1 α (CR:-0.216), con Ki-67 (CR:-0.172) y con el c-MYC (CR: -0.199), mientras que se ha observado una correlación positiva con KRAS (CR:0.781) y con AKT1y2 (CR:0.620 y CR: 0.859 respectivamente). Siendo todas ellas vías de señalización cuya activación promueven la proliferación y la metastatización de la célula tumoral, cabría esperar encontrar en todas ellas una correlación positiva con la captación de FDG. Veremos más adelante que, aunque estos genes individuales (que son factores de transcripción o primeros puntos de vías de señalización) no siempre se correlacionan positivamente con el SUV, sus dianas sí lo hacen, por lo que es necesario buscar la correlación de sus dianas con el SUV como signo indirecto de su activación.

Por otro lado es conocido, tal y como se menciona en la introducción, el papel en la reprogramación de la célula tumoral de HIF1, que participa incrementando la expresión de GLUT1 y HK2, y por tanto aumentando la captación de glucosa y su fosforilación respectivamente [13]. De forma similar determinados oncogenes como KRAS, BRAF y AKT incrementan la expresión y traslocación plasmática de GLUT1 y otros transportadores. P53, tanto en su forma *wild-type* como mutada, interviene en el control de la glicólisis [13], por ello sería de esperar una contribución positiva al SUV. También en la angiogénesis se obtienen resultados aparentemente contrapuestos, por ejemplo el VEGFA presenta una correlación positiva con el SUV (CR: 0.770) y sin embargo el ANGPT2 presenta una correlación negativa (CR: -0.170), como se comentará más adelante en el análisis bioestadístico de las *canonical pathways*.

De todas formas, el análisis aislado de una sonda o de su gen correspondiente, aporta una visión parcial de fenómenos altamente complejos como es el papel del metabolismo energético de la glucosa en la célula tumoral, por lo que no es de extrañar encontrar resultados contrapuestos entre diferentes autores, dependiendo de la metodología y población empleadas. La mayoría de los trabajos que analizan la asociación entre captación de FDG y distintas enzimas involucradas en la glicólisis o determinadas vías oncogénicas, proceden de series cortas que valoran además un único tipo histológico [85,88,114], introduciendo pues un sesgo importante. En este sentido se considera relevante la aportación de este trabajo, ya que es el único que presenta una firma basada en una población de pacientes con tumores metastásicos, y por tanto los resultados aportan señas de identidad comunes independientemente de la histología de procedencia. Además se ha analizado la correlación con el SUV de un elevado número de sondas (casi 23.000) y se han incluido más de 700 genes en los diferentes estudios bioinformáticos.

La necesaria interpretación complementaria de los resultados obtenidos a partir de la valoración aislada de una sonda o un gen, se ha establecido mediante el análisis bioinformático de las mismas estableciendo dos subgrupos de genes en función de su asociación positiva o negativa con el SUV. Se han valorado las interacciones proteína-proteínas derivadas de estos genes y la valoración de las vías preferentes de señalización (*canonical pathways*) mediante ssGSEA, que tienen en cuenta la participación de más de un gen y es más sensible en la detección de

cambios coordinados por grupos funcionales. De todas formas, no se puede dejar de resaltar que la captación de FDG es un fenómeno complejo cuya explicación requiere de la contribución de numerosos genes (más de 700 en nuestra firma), respecto a lo habitual en las firmas de predicción más utilizadas en clínica (MamaPrint®:70 genes, Oncotype DX® mama: 21 genes, Oncotype DX® colon:12 genes, Oncotype DX® próstata: 12 genes).

En nuestro estudio los resultados del análisis bioestadístico (que tienen en cuenta no sólo la sobre-representación estadística sino también la participación coordinada de los mismos), ponen de manifiesto la mayor contribución al incremento del SUV de los genes relacionados con el procesamiento del RNA mensajero (mRNA) y del RNA de transferencia (tRNA), la biogénesis de ribosomas y el procesamiento de proteínas (por ocupar los primeros puestos en significación estadística), por delante por ejemplo de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, la proliferación o la oncogénesis, que se encuentran entre los más estudiados en la literatura, como se ha comentado al principio.

La base de la síntesis de proteínas es la traducción del mRNA en una secuencia de aminoácidos, esta función se realiza en los ribosomas mediante el tRNA y con la participación de diferentes proteínas. La actividad de los ribosomas depende del RNA ribosómico (rRNA) que participa en la decodificación del mRNA y en la formación de enlaces peptídicos. Los ribosomas humanos están formados por dos subunidades cada una conformada por rRNA y múltiples proteínas ribosomales (más de 80). Es conocido que la tasa de crecimiento celular es proporcional al número de nuevos ribosomas que se forman [152]. Además, se ha establecido la relación entre oncogenes que promueven la biogénesis de ribosomas, el crecimiento celular y consecuentemente la proliferación celular como el MYC [153,154].

En este sentido, el ssGSEA muestra entre las *canonical pathways* estadísticamente significativas en el subgrupo de genes con correlación positiva con el SUV las que activan el MYC (*dang_regulated_by_myc_up*, CR: 0.2839) y por el contrario aparecen las que lo inhiben (*cooler_myc_targets_dn*, CR: -0.274) en el subgrupo con correlación negativa. Esto sería lo esperable encontrar en una célula tumoral de elevada actividad glicolítica y por tanto mayor SUV, que el dato aislado del C-MYC que aparece recogido en la tabla XVIII derivado de la valoración aislada de un gen, y que ofrecía una correlación negativa con el SUV.

Los resultados expuestos están en consonancia con los publicados por Palaskas y cols. [150], probablemente la primera firma de FDG recogida en la literatura. En su trabajo, si bien ha sido realizado con una metodología diferente como se comentará en el apartado siguiente de la discusión, exponen cómo aquellos tumores ávidos por la FDG muestran patrones de sobreexpresión, no solamente relacionados con las enzimas de la glicólisis y del ciclo de las pentosas fosfato, sino también con pasos críticos en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, y la transcripción del MYC. En la figura 32 se representa esquemáticamente la interacción del MYC en distintas fases encaminado al aumento de la transcripción y la síntesis de proteínas. Por otro lado, la inhibición de la biogénesis de ribosomas por parte de medicamentos anticancerosos puede contribuir de forma relevante a la eficacia de algunas combinaciones terapéuticas. La RNA polimerasa I por ejemplo, complejo multiproteico que sintetiza rRNA, está muy activa en la mayoría de los tumores [155]. Su inhibición selectiva ofrece una estrategia terapéutica común anticancerosa, bloqueando la proliferación celular. En este sentido grupos de investigación en colaboración con la industria biotecnologica han desarrollado pequeños compuestos que específicamente bloquean la transcripción del DNA ribosomal [153].

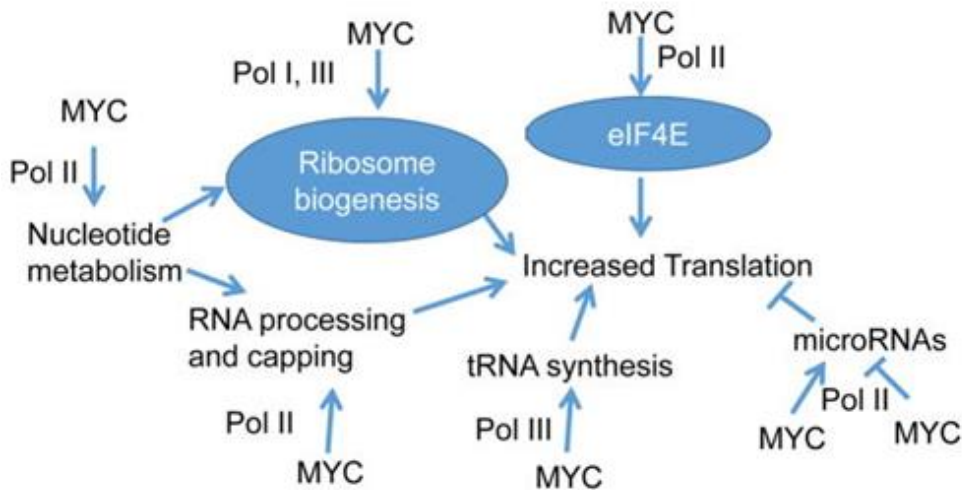


Fig. 32. MYC en su interacción con el ribosoma [154].

De forma paralela, entre las asociaciones proteicas más relevantes con correlación positiva con el SUV se encuentran chaperonas y otras proteínas que

intervienen en el procesamiento, plegamiento y transporte de proteínas, algunas con especial relevancia en situaciones de privación de oxígeno. En concreto merece una mención especial el papel central de HYOU1. El HYOU1 es un gen que codifica la proteína 150 reguladora de oxígeno (ORP150), que pertenece a la familia de las *heat-shock-proteins* 70. En condiciones de hipoxia, ORP150 puede acumularse en el retículo endoplásmico y proteger a la célula, mientras que su inhibición acelera la apoptosis [163]. Hay trabajos que muestran que la ORP150 está sobreexpresada en muchos tumores y que está estrechamente relacionada con la invasión y progresión tumoral [164-166] e incluso con el pronóstico en tumores nasofaríngeos [167].

También en este análisis, que tiene en consideración la significación estadística de las interacciones proteicas en este subgrupo correlacionado positivamente con el SUV, destacan las enzimas que intervienen en las distintas fases de preparación del pre-mRNA para lograr su funcionalidad, ensamblaje, elongación y *splicing*, las ribonucleoproteínas, las enzimas relacionadas con la biogénesis de ribosomas y las enzimas responsables de la glicosilación de proteínas. Igualmente corresponden a este subgrupo aquellas proteínas involucradas en distintas fases de la mitosis, del ciclo celular y, como cabría esperar, las enzimas de la glicólisis. Cuando una célula presenta una actividad ribosomal aumentada sus requerimientos energéticos aumentan y por tanto mantendría un elevado consumo de glucosa [7,9,152]. Sin embargo el metabolismo de la glucosa no sólo comprende la glicólisis. Algunas otras vías metabólicas también requieren glucosa como son la vía de las pentosas fosfato (que participa en la síntesis de ribonucleótidos y NADPH), la vía de las hexosaminas (que participan en la glicosilación de proteínas) y la glucogénesis, entre otras [13].

Entre los procesos biológicos más destacados que pertenecen al subgrupo de genes con correlación negativa con el SUV se han encontrado genes de adhesión a la matriz celular y entre las células, de reorganización del citoesqueleto mediante reestructuración y formación de filamentos de actina, activación de RHO y RAC GTPasas que participan en la traducción y transducción de señales, en la motilidad celular y el transporte intracelular, y de activación de vías de señalización de E-cadherina.

Nuestros resultados en relación con el papel de la activación de RHO y su correlación negativa con el SUV, al igual que ocurría con p53 (CR: -0.015),

contrastan aparentemente con los reportados por algunos autores [168,169]. En concreto Zhang y cols. han demostrado en líneas celulares de carcinoma de pulmón como la mutación de p53 estimula el efecto Warburg promoviendo la traslocación de GLUT1 a la membrana plasmática, precisamente mediado por la activación de RhoA/ROCK [168], y como las células que presentan la mutación de p53 muestran *in vitro* mayor captación de glucosa, mayor actividad glicolítica y mayor producción de lactato que las células control, por lo que cabría esperar una correlación positiva y no negativa con el SUV. Como se he comentado previamente, el análisis individual de los genes que son los factores de transcripción puede diferir de los resultados observados a partir de sus subproductos de activación.

Del análisis del subgrupo de sondas correlacionadas negativamente con el SUV, destacan los genes implicados en diferentes fases de la formación de neovasos y genes relacionados con la glucogenogénesis. Entre las asociaciones proteicas derivadas del análisis bioinformático de este subgrupo de sondas aparecen igualmente destacadas las enzimas asociadas con la adhesión celular y la reorganización del citoesqueleto, junto con proteínas ribosómicas y de finalización de la translación. Estos datos coinciden con los reflejados en el ssGSEA para este subgrupo, donde se encuentran representados de forma estadísticamente significativa las *canonical pathways* involucradas en la motilidad, adhesión celular y formación de neovasos, como son: *vascular smooth_muscle_contraction* (CR: -0.3827), *st_integrin_signaling_pathway* (CR:-0.3382), *pid_endothelin_pathway* (CR:-0.3101), *pid_ncadherin_pathway* (CR:-0.2782), *biocarta_integrin_pathway* (CR:-0.2759), *reactome_smooth_muscle_contraction* (CR: -0.274), *biocarta_myosin_pathway* (CR: -0.2689), *kegg_regulation_of_actin_cytoskeleton* (CR:-0.269) y *pid_lymph_angiogenesis_pathway* (CR:-0.2505).

En este trabajo, la presencia de tumor viable en las muestras tumorales extraídas para realización del array fue en su mayoría $\geq 50\%$, pero no podemos considerar despreciable la presencia de tejido estromal. Pueden interpretarse algunos de los resultados expuestos que relacionan las vías involucradas en la motilidad, adhesión celular, reorganización del citoesqueleto y formación de neovasos con el subgrupo de sondas correlacionadas negativamente con el SUV, a la luz de recientes avances que señalan la importante contribución del estroma y las células inmunes en la progresión de las células malignas [2a,3,8,170]. Podrían pues nuestros resultados obedecer por lo tanto no sólo a cambios estructurales de

la célula tumoral, sino a cambios ocurridos en el microambiente tumoral. Requieren una mención especial entre estas células del microambiente tumoral las endoteliales, encargadas de construir vasos sanguíneos y de proporcionar oxígeno cuando los recursos energéticos son limitados.

Las células endoteliales pueden permanecer quiescentes por años, pero cuando los tejidos padecen deprivación de nutrientes u oxígeno, o se incrementa su demanda como en los tumores, se lanzan a revascularizar los tejidos [157]. La célula endotelial es adicta a la glucosa y obtiene el 85% del ATP a través de la glicólisis, porcentaje significativamente más alto que otras células y equivalente a una célula tumoral. Aunque su actividad glicolítica basal es muy elevada, ésta incluso se dobla cuando la célula endotelial se activa. Hay autores que postulan que esta activación requiere un cambio en su metabolismo, que centran en el papel que desempeña la 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (PFKFB3), una kinasa cuya actividad facilita la producción de fructosa-2,6-bisfosfonato, que a su vez es un activador alostérico de la de la PFK1 [158]. De hecho, el bloqueo transitorio y parcial de la PFKFB3 en ratones detiene la angiogénesis patológica, mostrando cómo de sensibles son estas células a pequeños cambios en la glicólisis [159].

La PFK1 cataliza el paso crucial de la glicólisis, la conversión de la fructosa-6-fosfato (F-6-P) en fructosa-1,6-bisfosfato (F-1,6-P2). La PFK2, identificada décadas más tarde, convierte la F-6-P en F-2,6-P2, que funciona a su vez como activador alostérico de la PFK1 [157]. Una inhibición más completa de la glicólisis es posible y conduce a la detención total de cualquier tipo de angiogénesis (p.e a través de la inhibición de la PFK2), pero es más tóxica [158]. Además se ha visto que la PFKFB3 es necesaria para la migración celular y la remodelación de su citoesqueleto. De hecho, cuando la célula endotelial forma sus filopodios y lamelipodios para migrar, las enzimas glicolíticas se localizan en estas proyecciones, donde se asocian a los filamentos de actina. Esta compartimentalización permite la obtención local de ATP [157]. En la figura 33 se representa gráficamente la regulación de la glicólisis en los filopodios endoteliales y su participación en la angiogénesis. De Bock y cols. postulan que la reducción de los niveles de la PFK2 impide la angiogénesis reduciendo la capacidad de la célula endotelial de formar proyecciones móviles, migrar y generar neovasos [158]. Esta adaptación de la célula endotelial a una glicólisis aeróbica puede justificarse por tres motivos principales: reducir el

consumo propio de oxígeno para reservar el existente al tejido perivascular, adaptarse a su medio ambiente habitual que mayormente es hipóxico al moverse en zonas hipovascularizadas y obtener mejor rendimiento energético gracias a la mayor tasa de producción de ATP de la glicólisis fermentativa frente a la oxidativa, siempre que los recursos de glucosa sean ilimitados como ocurre cerca de los vasos sanguíneos [8].

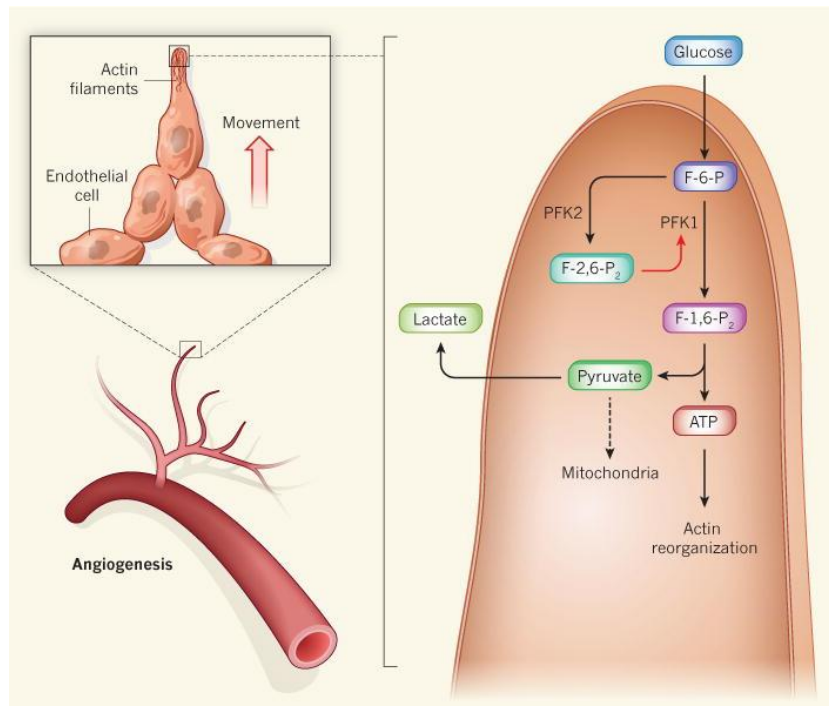


Fig. 33. La glicólisis regula la angiogénesis [157].

En los resultados mostrados hay determinados genes y sus subproductos proteicos que se correlacionan positivamente con el SUV como VEGFA y PFKB3, y sin embargo los procesos biológicos de angiogénesis están sobre-representados de manera significativa con los genes que se correlacionan negativamente con él. Una posible explicación de este fenómeno podría obedecer a que la angiogénesis es un fenómeno dinámico en los mecanismos de proliferación tumoral y metastatización, con la concurrencia en cada una de sus fases de diferentes genes y proteínas y de diferentes agentes de modulación en función de ello [157].

Cuando comienza la formación de neovasos las células endoteliales inician todo un complejo programa que transforma su estado quiescente en un estado de motilidad, proliferación y migración. Hay dos familias de receptores del VEGF, los receptores VEGF (VEGFRs) y los receptores Tie, éstos últimos restringidos a las células endoteliales en vertebrados. El VEGFR-1 frena la respuesta angiogénica, el VEGFR-2 es responsable de la formación de neovasos sanguíneos y el VEGFR-3 de los linfáticos. En varios modelos tumorales, las fases iniciales del crecimiento tumoral ocurren sin la participación de los vasos sanguíneos hasta que hay escasez de difusión de oxígeno y la célula tumoral sufre hipoxia. El complejo VEGFA/VEGFR-2 es el eje fundamental de activación de la angiogénesis que ocurre incluso durante las primeras fases de la transformación maligna. Esta activación, junto con la participación de VEGFC y D, promueve el reclutamiento de neovasos sanguíneos y linfáticos, el aumento de su tamaño y flujo, y por tanto la metastatización vascular o linfática [171].

Especial mención merecen en este apartado las enzimas involucradas en procesos autofágicos, de formación de vesículas endosómicas y anti-apoptóticos, también fuertemente sobre-representadas en el análisis bioestadístico en el subgrupo de sondas correlacionadas negativamente con el SUV. La autofagia juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y constituye una robusta barrera frente a la transformación maligna [160,161]. En las células tumorales las respuestas autofágicas son un mecanismo para hacer frente al estrés intracelular o microambiental y favorecer la progresión tumoral, y probablemente es un mecanismo dinámico que progresa a lo largo de la oncogénesis [160]. Tal y como se muestra en la figura 35, la célula sana parece estar protegida de la transformación maligna mediante una respuesta autofágica eficiente (A). En la transformación de la célula hacia un fenotipo tumoral metástasico y resistente al tratamiento pueden aparecer fenómenos autofágicos temporalmente ineficaces. En determinadas circunstancias durante la oncogénesis y la progresión tumoral puede haber una pérdida (B) o un incremento (C) de la competencia de los mecanismos autofágicos. Este concepto está sustentado en un creciente número de datos de la literatura que sostienen que la presencia de defectos en la maquinaria de la autofagia generalmente frenan la capacidad de proliferación, de diseminación y el potencial metastatizador de la célula tumoral. En las figuras 34 y 35 se muestran

algunas de las ventajas adaptativas aportadas por la autofagia a la célula tumoral y su dinámica a lo largo de la oncogénesis.

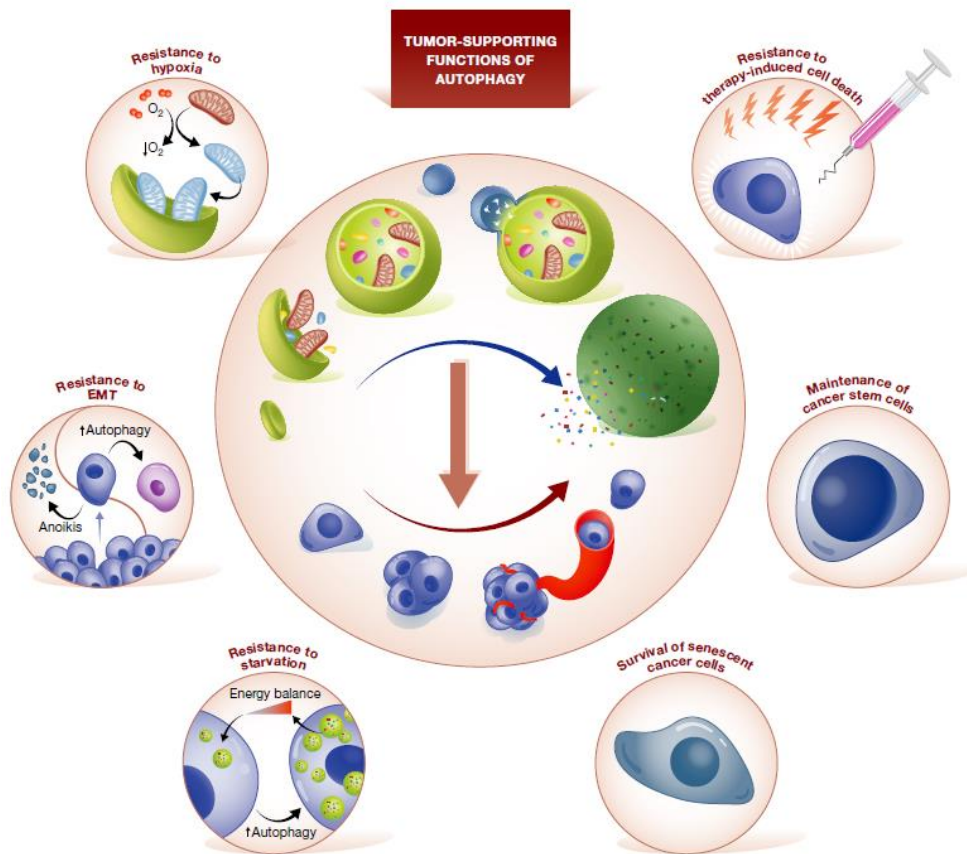


Fig. 34. Aportaciones de la autofagia a la célula tumoral [160].

De todas formas no están completamente aclarados en la actualidad cuáles son los mecanismos de regulación de la autofagia en cáncer y cómo éstos evolucionan temporalmente a lo largo de la progresión y metastatización de la célula tumoral [146].

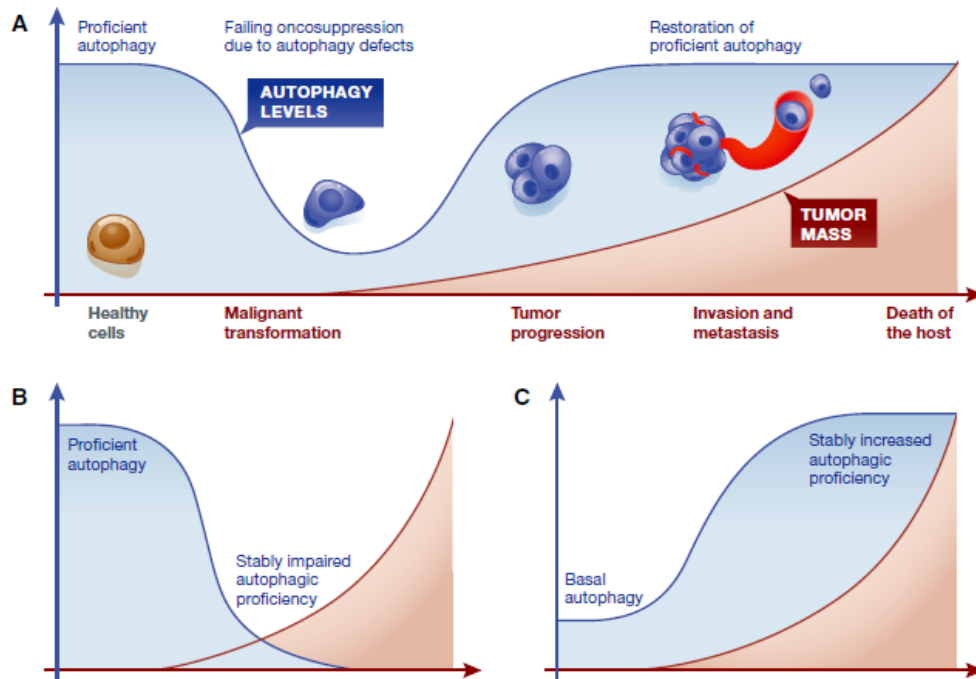


Fig. 35. Evolución de la autofagia en la oncogénesis [160].

Algunos autores que han observado la presencia de mecanismos autofágicos en fibroblastos envejecidos que estimulan el metabolismo de las células tumorales adyacentes cuando se cultivan juntos ambos grupos celulares [161]. Estos autores proponen que el estrés oxidativo estimularía la autofagia en los fibroblastos asociados a las células tumorales, a continuación aparecería la fagocitación de mitocondrias, su disfunción y el cambio metabólico a una glicólisis fermentativa en presencia de oxígeno. Este estado produciría metabolitos altamente energéticos como el L-lactato, los cuerpos cetónicos, la glutamina y los ácidos grasos, que serían transferidos a las células tumorales adyacentes para satisfacer sus requerimientos energéticos aumentados, proponiendo así una novedosa unión funcional entre el envejecimiento celular, la autofagia, el microambiente tumoral y su metabolismo.

También se han postulado moduladores de la autofagia como terapia anticancerosa [160], existiendo en la actualidad numerosos ensayos clínicos en marcha.

Por todo lo comentado previamente, estos resultados coincidentes en asignar una correlación negativa entre el SUV y la reorganización del citoesqueleto, la motilidad, formación de neovasos y la autofagia, pueden interpretarse como causados por una transición de la célula tumoral en estado relativamente quiescente, y por tanto con bajo requerimiento metabólico de glucosa y escasa captación de FDG, que comenzaría a activar todo un conjunto de mecanismos encaminados a iniciar su camino de progresión y metastatización [157-161,170,171]. Estos procesos, que de forma paulatina irán requiriendo un incremento en su consumo energético, pasarán por la activación del microambiente tumoral estromal que permita a la célula tumoral el acceso a las fuentes de oxígeno a través de la angiogénesis mediada principalmente por las células endoteliales. Cada vez son más las evidencias que apuntan a que los cambios metabólicos en las células estromales contribuyen de forma determinante al desarrollo del cáncer [2a,3,8,12,170]. Los procesos autofágicos contribuirían a mantener el equilibrio energético en situaciones de bajo metabolismo, por lo tanto con aportes bajos de glucosa. El fenómeno de autofagia como aportación energética adicional en condiciones de bajo consumo de glucosa probablemente explicaría de forma más directa la asociación negativa con el SUV encontrada.

En resumen, en la oncogénesis existiría un equilibrio tal que en condiciones de abundancia de glucosa predominarían los procesos biológicos tumorales: procesamiento del mRNA y del tRNA, la biogénesis de ribosomas y la síntesis y procesamiento de proteínas, la proliferación celular, la respuesta inmune y un metabolismo energético aumentado, mecanismos todos que conducirían a un mayor atrapamiento de FDG por parte del tumor. Sin embargo, en situaciones de escasez de glucosa (y por tanto con menor incorporación de FDG al tumor), predominarían los procesos biológicos del microambiente encaminados a incrementar el aporte de glucosa, como son los fenómenos de adhesión y de reorganización del citoesqueleto, de vasculogénesis y angiogénesis, de finalización de la transcripción, de motilidad celular y de transporte intracelular, de activación de vías de señalización de E-cadherina y fenómenos de autofagia.

Un punto fuerte del presente trabajo es la utilización combinada y complementaria de distintos recursos bioinformáticos (*DAVID, Consensus*

Pathways, *STRING* y *GSEA*) en la interpretación de los distintos aspectos de la biología asociada a la captación de FDG en tumores metastásicos, más allá de las correlaciones con el SUV de genes individuales obtenidos a partir de una regresión lineal univariada. Como se ha visto, ninguno de los recursos bioinformáticos utilizados por sí solo es capaz de aportar una perspectiva completa del fenómeno biológico que es el SUV que, a la vista de la diversidad de procesos metabólicos involucrados que se desprende de este estudio, cabe concluir que es un fenómeno sin duda complejo. Parece además involucrar, no sólo a las células tumorales, sino también al compartimento no tumoral.

Aunque es posible que en algunos subtipos tumorales predomine alguno de los procesos señalados, una de las intenciones pretendidas en nuestro estudio ha sido la elaboración de una firma (modelo predictivo de SUV) universal válida para cualquier tumor metastásico, al menos aquellos más representados en el *training set*. También es comprensible que, dada la complejidad de este fenómeno, se requieran un número notable de genes (sondas) para predecirlo, tal y como ha sucedido en alguna de las firmas de predicción de SUV en tumores primarios de pulmón previamente publicadas [149].

5.5 CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN EXTERNA DEL MODELO PREDICTIVO

Estos resultados muestran que se ha conseguido elaborar una firma genómica que capture los procesos biológicos comunes subyacentes a múltiples tumores humanos metastásicos, adquiriendo así una nueva perspectiva y un mejor entendimiento de la imagen metabólica FDG PET para su aplicación en la valoración precoz de la respuesta antitumoral. El RMSE (como se ha comentado el parámetro más usado en la literatura en la comparación de los modelos de regresión predictivos) de la serie de validación externa fue de 0.645, comprendido dentro del intervalo de confianza del 95% estimado en el *training set* mediante 10-fold CVx5 (RMSE entre 0.257 y 0.662). El RMSE, excluyendo el paciente considerado *outlier*, fue de 0.454 cuyo ajuste es equivalente a la media del modelo inicial estimado en el *cross-validation set* (RMSE medio 0.443).

El método estadístico de regresión empleado en la construcción del modelo es una contribución novedosa relevante del presente trabajo, ya que son métodos considerados de vanguardia en la modelización predictiva [141,144-146] que no se

han utilizado en esta indicación en las firmas de FDG realizadas con anterioridad [149-151]. El PLS (en nuestro caso ajustado para tres componentes), es un método supervisado que busca predecir simultáneamente la variabilidad de las sondas y del SUV, y que se considera óptimo para resolver este tipo de situaciones complejas donde se dispone de múltiples variables independientes (las 909 sondas) para una variable dependiente (SUV).

La primera firma genómica de FDG fue publicada por Palaskas y cols. en 2011 [150]. Para su confección se utilizaron diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, glioblastoma y melanoma y 18 pacientes con tumores primarios de mama, y el método estadístico *weighted gene voting* (WGV). Para cada tipo de tumor de su panel estableciendo dos clases: baja-FDG vs alta-FDG, incluyendo en cada subgrupo muestras con particularmente alta o baja captación de FDG para la realización del GSEA. Este GSEA se repitió para los 18 pacientes de cáncer de mama. Estos autores encontraron una fuerte correlación entre la captación medida en la imagen PET de FDG y la predicha por su modelo ($r=0.92$, permutación $p\text{-value}=0.03$).

El segundo precedente fue el publicado por Gevaert y cols. [140]. En este trabajo plantearon un abordaje “radiogenómico” en el que analizaron el microarray en una serie de 20 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y utilizando hasta 180 indicadores de imagen CT y PET/CT por paciente (153 informáticos extraídos de la imagen, 26 semánticos y uno metabólico, el SUV_{max}). Con estos datos realizaron una agrupación en base a la co-expresión de los genes representados en el array en 56 *clústeres* que conformarán sus respectivos metagenes. Para la confección del algoritmo predictivo usaron la regresión lineal. Estos autores concluyeron que se puede predecir los rasgos radiológicos a través del microarray en cáncer de pulmón con una “precisión” media del 72% (rango 59%-83%) y específicamente para el SUV del 78%. En su trabajo establecieron esta “precisión” como el cálculo del promedio de la diferencia en valor absoluto entre SUV medido y el SUV predicho, dividido por el rango. Aplicando esta fórmula en nuestra serie se calculó la “precisión” del PLS-3 para el *validation set*, con datos previamente no vistos por el modelo, que fue del 79% (la “precisión” calculada para el *training set* fue del 95%, como era esperable muy superior). Estos mismos autores realizaron una segunda publicación como continuación de su trabajo, ya centrado exclusivamente la correlación con distintos parámetros de cuantificación obtenidos

de la imagen PET con FDG, valorando hasta 14 diferentes indicadores de SUV por paciente [151]. Para la confección de las firmas los autores utilizaron aquellos indicadores de SUV con una “precisión” en la predicción mayor del 70% y se realizó adicionalmente una agrupación de las sondas en 15 metagenes, que correspondían con 508 genes individuales. La finalidad fue determinar la capacidad pronóstica de su firma en serie externa y en una propia de validación (84 pacientes con cáncer no microcítico de pulmón y un seguimiento medio de 38 meses). La firma que más se asociaba a la supervivencia en este trabajo en un análisis univariante fue la constituida por una combinación de 3 parámetros de SUV pero, coincidiendo con nuestros resultados, no encontraron significación estadística tras realizar un análisis multivariante que incluía factores pronósticos conocidos como el estadio o el tamaño tumoral (cohorte externa: HR=1.57, (CI: 0.85-2.91), p -value= 0.15; cohorte validación: HR=3.48, (CI: 0.39-31.0), p -value= 0.27).

En el presente estudio, en un intento de simplificar la firma basada en 909 sondas pero manteniendo la capacidad predictiva del modelo, se realizaron reducciones del número de sondas empleadas con los mejores coeficientes de regresión positivamente asociados con el SUV. Sin embargo, aunque el uso de 149 o 249 sondas podía disminuir la varianza en el *training set*, esto se producía a costa de aumentar el sesgo y empeorando la predicción para el *validation set*. El RMSE del PLS3-909 en el *validation set* fue de 0.645, mientras que los RMSE de PLS3-149 y PLS3-249 fueron 0.736 y 0.703, respectivamente.

Estos datos son consistentes con el conocido principio estadístico en modelización predictiva denominado *variance-bias trade-off*. Según este principio debe buscarse un equilibrio entre la varianza permitida en el *training set*, de forma que se logre disminuirla en la medida de lo posible sin comprometer el buen funcionamiento del modelo a la hora de probarlo en un *set* de validación independiente, evitando el fenómeno conocido como *overfitting* [172]. En nuestros datos las 909 sondas predictivas del SUV permiten un ajuste aceptable tanto en el *training set* como en el *validation set*. Sin embargo, la reducción de la firma a las 149 y 249 mejores sondas positivas muestra claramente *overfitting* en el *training set*, perdiendo por tanto capacidad predictiva para la serie independiente.

Por las consideraciones hechas en el apartado anterior sobre la complejidad biológica del SUV, y el hecho de que se hayan usado tumores metastásicos procedentes de distintos tipos histológicos, parece razonable pensar que hace falta

un número no despreciable de sondas para realizar una predicción en este escenario. Además pone de manifiesto que las sondas que se correlacionan de manera negativa con el SUV son relevantes para la eficiencia de la firma y para su uso en series independientes externas. Las 909 sondas elegidas en la elaboración de nuestro modelo mediante 10 *fold*-CV permiten una buena predicción tanto en el *training set* como en el *validation set* mediante PLS-3.

Es una limitación de este estudio el pequeño tamaño muestral del *validation set* ($n=13$), que además contaba con la inclusión de dos pacientes con tumores primarios avanzados (a diferencia de lo que ocurría en el *training set*, donde todos ellos eran metastásicos) y con la presencia de un paciente cuyo SUV quedaba por debajo del valor mínimo de la serie inicial (*influential observation*). No obstante los datos obtenidos se comparan favorablemente con los de Nair y cols. [151], que necesitaron 508 genes para predecir el SUV en un solo subtipo histológico (carcinoma de pulmón no microcítico). El presente estudio supone un avance frente al publicado por Palaskas y cols. [150] al haberse realizado en muestras de pacientes y no sólo en líneas celulares, que no reflejan adecuadamente la complejidad biológica del SUV que debe tener en cuenta el compartimento no tumoral, tal y como se ha demostrado en el apartado anterior. También se ha podido confirmar el valor de PLS-3 en la predicción del SUV_{max}, obteniéndose parámetros semejantes a los obtenidos con este modelo en el SUV_{med35} (datos no mostrados).

Por todo ello se puede concluir que se ha logrado confeccionar una firma genómica que predice adecuadamente la actividad metabólica de la glucosa de los tumores (en concreto prediciendo el SUV_{med35}) y que permite profundizar en el estudio y la comprensión de las vías metabólicas más relevantes partícipes de la captación de FDG. De esta forma se considera ésta una contribución a la mayor comprensión del papel de la glicólisis en la célula tumoral y de la participación del estroma y abre nuevas posibilidades a la tecnología PET/CT para incrementar su papel en la valoración precoz de la respuesta y el análisis de nuevas dianas terapéuticas dirigidas a bloquear la glicólisis en sus distintas fases.

Aunque este estudio no ha sido enfocado en su diseño metodológico a validar la respuesta metabólica con PET, la demostración de que la captación de FDG es un fenómeno complejo en el que participan un amplio abanico de procesos biológicos fundamentales para la supervivencia de la célula tumoral y para su capacidad de metastatización (y no sólo aquellos procesos relacionados de forma directa con

la glicólisis), permite apuntar al PET-FDG como una herramienta de utilidad en la valoración de la respuesta de forma precoz, ya que una terapia eficaz necesariamente afectaría a alguno de estos procesos vitales para la célula tumoral y por tanto presumiblemente tendrían su reflejo en la modificación del SUV.

6. CONCLUSIONES

1. El SUV_{med35} ha sido el parámetro de cuantificación PET seleccionado para la elaboración de la firma genómica de FDG por su robustez y mejor ajuste a las características deseables en la confección del modelo predictivo, aunque se ha demostrado una elevada correlación entre los distintos parámetros de cuantificación obtenidos, pudiéndose considerar éstos equivalentes tanto para la confección de la firma, como en la interpretación de los fenómenos biológicos subyacentes.

2. El estudio bioinformático de los microarrays de expresión realizados en lesiones biopsiadas de pacientes metastásicos con distintos subtipos histológicos, junto con la obtención del SUV en esas mismas localizaciones, ha permitido la confección de una firma genómica universal de predicción del SUV_{med35} .

3. En este trabajo se ha demostrado que la selección de las 909 sondas realizadas mediante regresión lineal univariada es capaz de discriminar, de manera no supervisada, distintos grupos de pacientes en relación al SUV y no a otros datos clínico-patológicos o pronósticos, distinguiendo 5 *clusters* con diferencias significativas entre sus medias de SUV.

4. En los estudios bioinformáticos realizados en los genes seleccionados para la elaboración del modelo predictivo del SUV, se ha constatado que:

a) una interpretación más completa de los distintos aspectos de la biología asociada a la captación de FDG en tumores metastásicos requiere de la utilización combinada y complementaria de distintos recursos bioinformáticos, no siendo posible que ninguno de ellos por sí solo sea capaz de aportar una perspectiva completa del fenómeno biológico complejo que es la captación glucosa, que requiere de un notable número de genes para su predicción.

b) en la interpretación del significado biológico de las subredes de genes con correlación positiva o negativa con el SUV se deduce que, en condiciones de abundancia de glucosa (SUV alto) predominarían los procesos biológicos proliferativos celulares como el procesamiento del mRNA y del tRNA, la biogénesis de ribosomas, el procesamiento de proteínas, la proliferación celular, la

respuesta inmune y un metabolismo energético aumentado. Sin embargo en situaciones de escasez de glucosa (SUV bajo), predominarían los procesos biológicos del microambiente encaminados a proporcionar un mayor aporte de glucosa al tumor, como son los fenómenos de adhesión y de reorganización del citoesqueleto, de vasculogénesis y angiogénesis, de finalización de la transcripción, de motilidad celular y de transporte intracelular, de activación de vías de señalización de E-cadherina y fenómenos de autofagia.

5. El PLS de 3 componentes es el modelo estadístico que ha demostrado una mejor capacidad predictiva para el SUV en nuestra serie, en comparación con otros métodos de probada eficacia en otras situaciones tales como PCR, RF y SVM.

6. La firma genómica de FDG elaborada podría permitir discriminar qué pacientes pueden beneficiarse de la tecnología PET/CT para una valoración precoz de la respuesta.

7. LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

7.1 LIMITACIONES

1. Como se ha mencionado en el apartado 3 una limitación de este estudio es el pequeño tamaño muestral del *validation set* (n=13), que además contaba con la inclusión de dos pacientes con tumores primarios avanzados (a diferencia de lo que ocurría en el *training set*, dónde todos ellos eran metastásicos) y con la presencia de un paciente cuyo SUV quedaba por debajo del valor mínimo de la serie inicial (*influential observation*). Esta limitación no pudo subsanarse ya que la tasa de reclutamiento para el estudio fue baja, requiriéndose 5 años para el reclutamiento retrospectivo de los pacientes del *trainig set* (n=71) que se utilizaron en la confección de la signatura, y 12 meses para la formación del *validation set* (n=13). Sin embargo el comportamiento del modelo predictivo, aún exponiendolo a una serie de validación *a priori* no favorable, se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% estimado en el modelo inicial mediante 10 fold-CV (rango RMSE *training set* [0.257-0.662]; RMSE *validation set* 0.645). Si bien es cierto que la exclusión del paciente considerado *influential observation* mejoraba sensiblemente la predicción, que mostraba entonces un ajuste similar al RMSE medio observado en el modelo inicial (RMSE medio inicial 0.443 vs RMSE medio *validation set* 0.454).

2. La capacidad de mejorar la predicción del modelo se ve condicionada a su vez por otra limitación infranqueable del estudio derivada del error intrínseco asociado a la obtención de la variable dependiente (la respuesta), en nuestro caso el SUV. Como se ha mencionado existen una gran cantidad de factores que afectan al cálculo del SUV, como son los aspectos metodológicos relacionados con la preparación del paciente y su propia fisiología, y los derivados de la obtención, procesado y cuantificación del estudio, que pueden llegar a suponer más de un 20% de variación en la obtención de ésta medida. Además, se han recogido en la literatura diferencias en cuanto a la reproducibilidad interobservador en su obtención de entorno al 10%. En este trabajo el porcentaje de la varianza del SUV explicado por el tercer componente del PLS-3 fue superior al 89% (la “precisión” del SUV según Gevaert y cols. para los datos del *validation set* fue del 79%), por lo

que se considera este margen del 10% probablemente un error irreductible asociado a la propia medida de la variable respuesta, el SUV.

7.2 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Se plantean dos nuevas líneas de investigación que complementarían los resultados expuestos.

1. Podría ser de interés la aplicación a nuestra serie de pacientes metastásicos de una signatura específica para determinar la presencia de linfocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales y poder esclarecer así la contribución microambiente tumoral al SUV.

2. Se podría analizar, en aquellos genes de la signatura identificada que presentan valores de centralidad más altos, la presencia de alteraciones genómicas mediante la utilización de repositorios públicos, con el fin de saber si estos genes son dianas frecuentes de dichas alteraciones. Si fuera así, este hecho prestaría apoyo adicional al uso de esta signatura en tumores sólidos variados.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1. LISTADO COMPLETO DE LAS 909 SONDAS SELECCIONADAS PARA LA GENERACIÓN DEL MODELO MULTIVARIADO CON SU COEFICIENTE DE REGRESIÓN (CR).

ProbeID	Símbolo gen	Denominación del gen	CR
A_23_P134225	LRRC61	leucine rich repeat containing 61	1,71
A_23_P90130	NAPSA	napsin A aspartic peptidase	1,69
A_23_P127533	DCUN1D5	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)	1,68
A_23_P217637	TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	1,66
A_23_P16908	DHX57	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57	1,62
A_23_P67288	CALR	calreticulin	1,62
A_23_P28318	C2orf56	chromosome 2 open reading frame 56	1,57
A_23_P358417	TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	1,56
A_24_P653603	C17orf89	chromosome 17 open reading frame 89	1,55
A_23_P213584	HK3	hexokinase 3 (white cell)	1,54
A_23_P110504	CLPTM1L	CLPTM1-like	1,51
A_23_P319719	PGAM5	phosphoglycerate mutase family member 5	1,51
A_23_P90589	MRPL44	mitochondrial ribosomal protein L44	1,50
A_23_P211659	CERK	ceramide kinase	1,50
A_23_P55190	EFTUD2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	1,49
A_23_P29303	RRP7A	ribosomal RNA processing 7 homolog A (S. cerevisiae)	1,49
A_23_P77360	CIAO1	cytosolic iron-sulfur protein assembly 1 homolog (S. cerevisiae)	1,48
A_23_P76969	SIPA1L1	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	1,48
A_23_P44195	MSI2	musashi homolog 2 (Drosophila)	1,46
A_23_P211488	APOL2	apolipoprotein L, 2	1,44
A_24_P71021	GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	1,44

A_23_P150583	SCGB1A1	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)	1,43
A_32_P171143	LOC389458	hypothetical LOC389458	1,43
A_24_P37962	HK3	hexokinase 3 (white cell)	1,43
A_23_P321703	BCL2A1	BCL2-related protein A1	1,42
A_24_P83158	RRP7B	ribosomal RNA processing 7 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	1,42
A_23_P119337	ATF5	activating transcription factor 5	1,42
A_23_P385034	E2F3	E2F transcription factor 3	1,42
A_23_P137665	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1,41
A_24_P196827	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	1,41
A_23_P253561	TTPAL	tocopherol (alpha) transfer protein-like calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	1,40
A_24_P219785	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	1,40
A_23_P98431	HMBS	hydroxymethylbilane synthase	1,40
A_23_P51187	PRKCZ	protein kinase C, zeta	1,40
A_23_P103885	AURKAIP1	aurora kinase A interacting protein 1	1,40
A_32_P107029	NAPSA	napsin A aspartic peptidase	1,40
A_23_P155106	CCDC134	coiled-coil domain containing 134	1,39
A_23_P136573	ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 5	1,38
A_23_P82642	LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)	1,36
A_23_P40975	EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	1,36
A_32_P194264	CHAC2	ChaC, cation transport regulator homolog 2 (<i>E. coli</i>)	1,36
A_23_P93360	AGER	advanced glycosylation end product- specific receptor	1,36
A_23_P168629	RBM28	RNA binding motif protein 28	1,35
A_23_P42302	HLA-DQA2	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	1,35
A_23_P163630	ZNF276	zinc finger protein 276	1,34
A_23_P136683	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	1,34
A_23_P774	DENND4B	DENN/MADD domain containing 4B	1,33
A_23_P17044	SFTPB	surfactant protein B	1,33
A_23_P115861	ZNF485	zinc finger protein 485	1,33
A_24_P274111	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1,33

A_23_P165707	LYG1	lysozyme G-like 1	1,32
A_23_P27894	SAFB2	scaffold attachment factor B2	1,32
A_23_P76435	GATC	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C homolog (bacterial)	1,32
A_32_P122793	C22orf27	chromosome 22 open reading frame 27	1,32
A_23_P27840	SUPT5H	suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae)	1,31
A_23_P28068	GTPBP3	GTP binding protein 3 (mitochondrial)	1,31
A_23_P138465	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	1,30
A_24_P81789	RHOF	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	1,30
A_23_P109304	SLC5A3	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3	1,30
A_23_P369479	MSI2	musashi homolog 2 (Drosophila)	1,30
A_23_P80389	TRMU	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase	1,30
A_32_P102300			1,30
A_23_P116187	BCO2	beta-carotene oxygenase 2	1,30
A_23_P75978	CLPB	ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)	1,29
A_32_P359110	KLHL17	kelch-like 17 (Drosophila)	1,29
A_24_P335620	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	1,29
A_23_P209954	GPLY	granulysin	1,29
A_23_P42802	PDIA4	protein disulfide isomerase family A, member 4	1,28
A_23_P27493	PPAN	peter pan homolog (Drosophila)	1,28
A_23_P34325	LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	1,27
A_24_P67681	LOC441795	high mobility group protein B3-like protein-like	1,27
A_24_P184230	AASDHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	1,27
A_23_P60517	FXN	frataxin	1,27
A_24_P206343	MYO1G	myosin IG	1,27
A_24_P289376	C2orf68	chromosome 2 open reading frame 68	1,26
A_23_P426398	PGAM5	phosphoglycerate mutase family member 5	1,26

A_24_P51517	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	1,26
A_23_P410059	CIAO1	cytosolic iron-sulfur protein assembly 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,26
A_23_P15174	MT1F	metallothionein 1F	1,26
A_23_P418051	LOC339803	hypothetical protein LOC339803	1,26
A_23_P102117	WNT10A	wingless-type MMTV integration site family, member 10A	1,25
A_23_P161297	OGDHL	oxoglutarate dehydrogenase-like LOC729991-MEF2B readthrough transcript	1,25
A_24_P31583	LOC729991-MEF2B	transcript	1,25
A_24_P303594	ACTR3B	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)	1,24
A_32_P224253	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11	1,24
A_23_P64010	MTCH2	mitochondrial carrier homolog 2 (<i>C. elegans</i>)	1,24
A_23_P254340	RPN1	ribophorin I	1,24
A_23_P251248	TBCC	tubulin folding cofactor C	1,24
A_23_P104734	STT3A	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	1,24
A_23_P316460	C7orf29	chromosome 7 open reading frame 29	1,24
A_24_P21727	C11orf57	chromosome 11 open reading frame 57	1,23
A_24_P298846	C6orf120	chromosome 6 open reading frame 120	1,23
A_23_P336015	NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,23
A_23_P17769	DDT	D-dopachrome tautomerase	1,23
A_23_P59507	SH2B2	SH2B adaptor protein 2	1,23
A_24_P93901	SIN3B	SIN3 homolog B, transcription regulator (yeast)	1,23
A_23_P11390	VCY	variable charge, Y-linked minichromosome maintenance complex component 10	1,22
A_23_P161474	MCM10	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	1,22
A_23_P1292	ERCC6		1,22
A_32_P130536			1,22
A_23_P216043	DERL1	Der1-like domain family, member 1	1,22
A_23_P357780	FDX1	ferredoxin 1	1,21
A_23_P46928	PFKP	phosphofructokinase, platelet LSM14B, SCD6 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	1,21
A_23_P323783	LSM14B		1,21

A_23_P74688	ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B	1,20
A_23_P127995	CLNS1A	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	1,20
A_23_P39445	MEX3D	mex-3 homolog D (C. elegans)	1,20
A_23_P32463	EXOSC4	exosome component 4	1,20
A_23_P200222	LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	1,19
A_24_P418386	LOC644422	similar to arginine/serine-rich splicing factor 6	1,19
A_24_P152713			1,19
A_24_P781757	LOC148413	hypothetical LOC148413	1,19
A_32_P93391	NUDT19	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	1,18
A_23_P211302	WDR4	WD repeat domain 4	1,18
A_24_P344053	SIPA1L1	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	1,18
A_23_P417363	CLIP4	CAP-Gly domain containing linker protein family member 4	1,18
A_23_P24068	BMS1	BMS1 homolog, ribosome assembly protein (yeast)	1,18
A_23_P25194	HRK	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	1,18
A_32_P192842	LOC100293208	hypothetical protein LOC100293208	1,17
A_24_P250666	SFTPC	surfactant protein C	1,17
A_23_P86002	TMED5	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	1,17
A_23_P39215	NUDT19	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	1,17
A_23_P102113	WNT10A	wingless-type MMTV integration site family, member 10A	1,17
A_23_P122563	PFDN6	prefoldin subunit 6	1,16
A_23_P116123	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	1,16
A_24_P222365	LARP4	La ribonucleoprotein domain family, member 4	1,16
A_23_P168080	SKIV2L	superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)	1,16
A_24_P195714			1,16
A_23_P155123	CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	1,16

A_23_P168576	POMZP3	POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion	1,16
A_23_P206441	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	1,16
A_23_P105475	SLCO1B3	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	1,16
A_23_P25313	BRI3BP	BRI3 binding protein	1,16
A_23_P208310	CD3EAP	CD3e molecule, epsilon associated protein	1,15
A_24_P464238			1,15
A_23_P65651	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	1,15
A_24_P175347	DERL1	Der1-like domain family, member 1	1,15
A_24_P52168			1,15
A_24_P92367	YDJC	YdjC homolog (bacterial)	1,15
A_23_P2601	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1,15
A_32_P207360	AK2	adenylate kinase 2	1,15
A_32_P8402	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	1,14
A_24_P67063			1,14
A_24_P413437	NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	1,14
A_23_P126727	NOL9	nucleolar protein 9	1,14
A_23_P15123	UBFD1	ubiquitin family domain containing 1	1,14
A_23_P119143	ICAM5	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin	1,14
A_24_P390668	FMNL1	formin-like 1	1,14
A_24_P162929	FAM119A	family with sequence similarity 119, member A	1,14
A_23_P103172	TYW3	tRNA-yW synthesizing protein 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,14
A_23_P119677	HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	1,14
A_23_P206707	MT1G	metallothionein 1G	1,14
A_24_P917951	NOC2L	NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor	1,14
A_23_P126103	CTH	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	1,13
A_23_P19712	GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	1,13
A_23_P74290	GBP5	guanylate binding protein 5	1,13
A_23_P95027	ANKRD39	ankyrin repeat domain 39	1,13

A_23_P97365	LRRC8D	leucine rich repeat containing 8 family, member D	1,13
A_23_P422193	SUV39H1	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	1,13
A_24_P108451	GPI	glucose phosphate isomerase	1,13
A_23_P119617	SF4	splicing factor 4	1,12
A_32_P115122	LOC100289373	similar to hCG2041645	1,12
A_23_P383278	PYCRL	pyrroline-5-carboxylate reductase-like	1,12
A_23_P329286	ZNHIT2	zinc finger, HIT type 2	1,12
A_23_P53288	CNPY2	canopy 2 homolog (zebrafish)	1,12
A_24_P24685	LOC729595	similar to high mobility group box 3	1,12
A_23_P201357	ATAD3A	ATPase family, AAA domain containing 3A	1,12
A_23_P8513	SNX10	sorting nexin 10	1,12
A_24_P298877	C1orf174	chromosome 1 open reading frame 174	1,12
A_23_P74097	TCEB3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kDa, elongin A)	1,12
A_32_P62342	GXYLT1	glucoside xylosyltransferase 1	1,12
A_23_P399292			1,12
A_23_P115523	JMJD4	jumonji domain containing 4	1,12
A_23_P373119	HMGB3L1	high-mobility group box 3-like 1	1,11
A_23_P41528	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	1,11
A_23_P101992	MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	1,11
A_24_P50937	LOC100128842	hypothetical protein LOC100128842	1,11
A_23_P49972	CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	1,11
A_23_P60943	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	1,11
A_23_P15202	DHODH	dihydroorotate dehydrogenase	1,11
A_23_P136787	GINS4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)	1,11
A_23_P120270	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2	1,11
A_23_P47735	RELT	RELT tumor necrosis factor receptor	1,11
A_23_P165301	RPE	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	1,11
A_23_P339098	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2	1,11
A_24_P389994	NADK	NAD kinase	1,11
A_23_P108054	TMEM86B	transmembrane protein 86B	1,11
A_23_P150092	SEPHS1	selenophosphate synthetase 1	1,11

A_32_P8653	TPRG1-AS1	TPRG1 antisense RNA 1 nucleolar and coiled-body	1,10
A_23_P314151	NOLC1	phosphoprotein 1	1,10
A_23_P379630	SLC38A10	solute carrier family 38, member 10	1,10
A_24_P20292	B3GNT7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N- acetylglucosaminyltransferase 7	1,10
A_23_P130304	TXNL4A	thioredoxin-like 4A	1,10
A_23_P82316	PRKRIP1	PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)	1,10
A_23_P311869	ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 5	1,10
A_23_P212458	SEC61A1	Sec61 alpha 1 subunit (<i>S. cerevisiae</i>)	1,10
A_23_P133216	NLN	neurolysin (metallopeptidase M3 family)	1,10
A_32_P235159	MSL3L2	male-specific lethal 3-like 2 (<i>Drosophila</i>)	1,10
A_23_P52298	NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin 3	1,09
A_23_P100469	TXNL4B	thioredoxin-like 4B	1,09
A_23_P74115	RAD54L	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)	1,09
A_23_P132027	SPAG4	sperm associated antigen 4	1,09
A_23_P253421	AUP1	ancient ubiquitous protein 1	1,09
A_24_P521544			1,09
A_23_P47426	ACAD8	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8	1,09
A_23_P257542	MYO1G	myosin IG	1,09
A_23_P164650	APOE	apolipoprotein E	1,08
A_23_P90587	HS6ST1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1	1,08
A_23_P138058	NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,08
A_23_P56567	GEMIN6	gem (nuclear organelle) associated protein 6	1,08
A_23_P217236	HMGB3	high-mobility group box 3	1,08
A_23_P414771			1,08
A_23_P163380	MTHFS	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)	1,08
A_23_P79416	FBXO11	F-box protein 11	1,08
A_23_P28375	GMCL1	germ cell-less homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	1,08
A_23_P257593	LOH12CR1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1	1,08
A_24_P376339	CCNL2	cyclin L2	1,08

A_32_P105773	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	1,08
A_23_P35021	B3GALT6	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase polypeptide 6	1,08
A_24_P257099	HJURP	Holliday junction recognition protein	1,08
A_23_P19510	HLA-DQB2	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2	1,08
A_24_P85099	HMGA2	high mobility group AT-hook 2	1,08
A_23_P143535	WDR4	WD repeat domain 4	1,07
A_23_P75647	HYOU1	hypoxia up-regulated 1	1,07
A_24_P133671	ZNF276	zinc finger protein 276	1,07
A_23_P104798	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	1,07
A_24_P118247	CTU2	cytosolic thiouridylase subunit 2 homolog (S. pombe)	1,07
A_32_P137336	MPP6	membrane palmitoylated protein 6	1,07
A_32_P353677	ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B	1,07
A_23_P251771	PUS1	pseudouridylate synthase 1	1,07
A_23_P65481	TEP1	telomerase-associated protein 1	1,07
A_24_P595223	MIAT	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)	1,07
A_23_P145006	SCGB3A2	secretoglobin, family 3A, member 2	1,07
A_23_P107994	TMEM160	transmembrane protein 160	1,06
A_23_P68970	ARFGAP3	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3	1,06
A_23_P93082	NUS1	nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog (S. cerevisiae)	1,06
A_23_P106562	GALNS	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase	1,06
A_24_P139773	PPP1R8	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8	1,06
A_23_P105212	THRSP	thyroid hormone responsive (SPOT14) homolog, rat	1,06
A_23_P202715	PHF21A	PHD finger protein 21A	1,06
A_24_P51588	CCNL2	cyclin L2	1,06
A_24_P123347	PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	1,05
A_24_P76288			1,05
A_24_P213034			1,05
A_24_P406693	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	1,05

A_32_P27327			1,05
A_23_P95213	SFTPC	surfactant protein C	1,05
A_23_P258071	RNF113A	ring finger protein 113A	1,05
A_23_P41255	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	1,05
A_23_P369987	KIAA0317	KIAA0317	1,05
A_32_P172917	LOC100288755	hypothetical LOC100288755 chromosome 10 open reading frame	1,05
A_23_P97952	C10orf125	125	1,05
A_23_P206369	TMEM208	transmembrane protein 208	1,05
A_23_P203075	USP28	ubiquitin specific peptidase 28	1,05
A_24_P204515			1,05
A_32_P12065			1,05
A_23_P27656	C19orf48	chromosome 19 open reading frame 48	1,05
A_23_P117933	GCSH	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	1,05
A_23_P60479	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,05
A_23_P315336	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	1,05
A_23_P73992	USP24	ubiquitin specific peptidase 24	1,05
A_24_P63262	RPN1	ribophorin I	1,05
A_32_P139654	SS18L1	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1	1,04
A_24_P4212	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase-like	1,04
A_24_P105164	MAGT1	magnesium transporter 1	1,04
A_23_P50455	POLD1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa	1,04
A_24_P331711	THEM5	thioesterase superfamily member 5	1,04
A_23_P4798	ZNF581	zinc finger protein 581	1,04
A_32_P86739	C10orf114	chromosome 10 open reading frame 114	1,04
A_32_P98979	LRP8	LDL receptor related protein 8 (LRP8)	1,04
A_23_P214425	NFYA	nuclear transcription factor Y, alpha family with sequence similarity 136,	1,04
A_23_P108641	FAM136A	member A	1,04
A_24_P943843			1,03
A_23_P334103	LOH12CR1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1	1,03
A_23_P162256	DENR	density-regulated protein	1,03
A_23_P149099	DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1,03

A_23_P345139	C19orf28	chromosome 19 open reading frame 28	1,03
A_24_P272073			1,03
A_23_P142380	AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8	1,03
A_23_P155049	APOL6	apolipoprotein L, 6	1,03
A_32_P93807			1,03
		phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	
A_23_P41280	PAICS		1,03
A_24_P307424			1,03
A_24_P77364	BOLA3	bolA homolog 3 (E. coli)	1,03
A_24_P878419	LOC645360	high mobility group box 3 pseudogene 5	1,03
A_24_P944040	RRP1B	ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)	1,03
A_23_P71053	MPP6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	1,03
A_24_P298464			1,03
A_23_P74914	URB2	URB2 ribosome biogenesis 2 homolog (S. cerevisiae)	1,03
A_23_P50357	ARHGEF18	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	1,02
A_23_P202988	AASDHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	1,02
A_23_P123022	YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	1,02
A_24_P405054	C1orf144	chromosome 1 open reading frame 144	1,02
A_23_P130900	NCLN	nicalin homolog (zebrafish)	1,02
A_24_P412088	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	1,02
A_23_P80129	RRP1	ribosomal RNA processing 1 homolog (S. cerevisiae)	1,02
A_23_P145817	C7orf30	chromosome 7 open reading frame 30	1,02
A_23_P28105	TSN	translin	1,02
A_23_P59528	ACN9	ACN9 homolog (S. cerevisiae)	1,02
A_23_P132260	PES1	pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	1,02
A_24_P780609	LOC390618	ribosomal protein L7 like 1 pseudogene	1,02

		eukaryotic translation elongation	
A_23_P156842	EEF1E1	factor 1 epsilon 1	1,02
A_23_P58337	FIP1L1	FIP1 like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,02
A_23_P207905	SECTM1	secreted and transmembrane 1	1,02
A_24_P64401	LOC84856	hypothetical LOC84856	1,02
A_23_P101392	TMEM38A	transmembrane protein 38A	1,01
A_23_P104651	CDCA5	cell division cycle associated 5	1,01
A_23_P143242	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,01
A_23_P336040	GOPC	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing	1,01
A_23_P165171	TMEM161A	transmembrane protein 161A	1,01
A_32_P213002			1,01
A_23_P203463	TAF10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30kDa	1,01
A_23_P115246	FCN3	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 3 (Hakata antigen)	1,01
A_23_P103631	EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2	1,01
A_24_P282363	KIAA1875	KIAA1875	1,01
A_32_P169353			1,01
A_23_P20732	GTF3C4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	1,01
A_32_P107617	SFTPD	surfactant protein D	1,01
A_23_P89798	FECH	ferrochelatase (protoporphyrin)	1,01
A_24_P103803	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	1,01
A_32_P149967			1,01
A_24_P941167	APOL6	apolipoprotein L, 6	1,01
A_23_P409386	SLC25A22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	1,01
A_24_P367397			1,01
A_24_P358116			1,01
A_23_P80362	NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,01
A_24_P42122	HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	1,00
A_24_P12932	MRPS16	mitochondrial ribosomal protein S16	1,00
A_24_P38895	H2AFX	H2A histone family, member X	1,00
A_23_P393620	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	1,00
A_24_P277295	RAB43	RAB43, member RAS oncogene family	1,00

A_24_P916195	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	1,00
A_23_P48886	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	1,00
A_23_P145024	ADRB2	adrenergic, beta-2-, receptor, surface	-1,00
A_23_P37497	MYO1E	Human myosin-IC mRNA, complete cds. [U14391]	-1,00
A_23_P96285	REEP1	receptor accessory protein 1	-1,00
A_23_P29257	H1F0	H1 histone family, member 0	-1,00
A_23_P218965	LARS	leucyl-tRNA synthetase	-1,00
A_23_P252403	COMM10	COMM domain containing 10	-1,00
A_23_P35414	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	-1,00
A_23_P87421	PRSS23	protease, serine 23	-1,00
A_24_P295379	GPR107	G protein-coupled receptor 107	-1,00
A_23_P151368	N6AMT2	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 2 (putative)	-1,00
A_23_P166633	ITGB5	integrin, beta 5	-1,00
A_23_P125157	NFATC2IP	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	-1,00
A_23_P381449	SP2	Sp2 transcription factor	-1,00
A_23_P372255	ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	-1,00
A_24_P12181	UBTD2	ubiquitin domain containing 2	-1,00
A_24_P830667	RPL21	ribosomal protein L21	-1,00
A_23_P136777	APOD	apolipoprotein D	-1,01
A_23_P71867	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	-1,01
A_24_P575336	RPL6P3	ribosomal protein L6 pseudogene 3	-1,01
A_23_P108157	TJP3	tight junction protein 3 (zona occludens 3)	-1,01
A_23_P157527	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	-1,01
A_24_P25354	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	-1,01
A_32_P147324			-1,01
A_23_P347131	TRAPPC12	tetratricopeptide repeat domain 15	-1,01
A_24_P84808	RPL7P50	ribosomal protein L7 pseudogene 50	-1,01
A_23_P304682	EMP2	epithelial membrane protein 2	-1,01
A_23_P90762	STK39	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)	-1,01
A_24_P142151	LRRC28	leucine rich repeat containing 28	-1,01
A_24_P264772	PPIAL4A	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4A	-1,01

A_24_P850187			-1,01
A_24_P157342	C3orf10	chromosome 3 open reading frame 10	-1,01
A_23_P367610	SESTD1	SEC14 and spectrin domains 1	-1,01
A_23_P170273	SEC31A	SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,01
A_32_P42574	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	-1,01
A_23_P43337	FREM1	FRAS1 related extracellular matrix 1	-1,01
A_24_P940125	CNOT6	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	-1,01
A_23_P44505	KLF11	Kruppel-like factor 11	-1,01
A_23_P110712	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,01
A_23_P218928	FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	-1,01
A_23_P374695	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial	-1,01
A_23_P140928	TMC7	transmembrane channel-like 7	-1,01
A_32_P4608			-1,01
A_23_P344421	ROBO4	roundabout homolog 4, magic roundabout (<i>Drosophila</i>)	-1,01
A_24_P127159	LOC346329	similar to guanine nucleotide binding protein, alpha 11	-1,01
A_24_P29885	NOV	nephroblastoma overexpressed gene	-1,02
A_24_P944570	PXDN	peroxidasin homolog (<i>Drosophila</i>)	-1,02
A_24_P56270	DYRK2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	-1,02
A_24_P296772	PPP1R14A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	-1,02
A_23_P7655	BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	-1,02
A_23_P134827	ASH2L	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (<i>Drosophila</i>)	-1,02
A_23_P305292	LOC728264	hypothetical LOC728264	-1,02
A_23_P501831	C5orf4	chromosome 5 open reading frame 4	-1,02
A_23_P47077	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	-1,02
A_24_P923113	TMOD3	tropomodulin 3 (ubiquitous)	-1,02
A_23_P311192	SPTLC1	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	-1,02
A_23_P253345	C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	-1,02
A_32_P137632	FBXL17	F-box and leucine-rich repeat protein 17	-1,02
A_23_P395493	CFLP1	cofilin pseudogene 1	-1,02
A_32_P59475	MYL9	Homo sapiens myosin light chain 9	-1,02
A_23_P30307	MED7	mediator complex subunit 7	-1,02

A_23_P24260	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	-1,02
A_24_P157424	NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa	-1,02
A_32_P50834	DIAPH2	diaphanous homolog 2 (Drosophila)	-1,02
A_23_P205841	MYO9A	myosin IXA	-1,02
A_23_P111583	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-1,02
A_23_P106617	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	-1,03
A_24_P221375			-1,03
A_32_P135818	RPS3A	ribosomal protein S3A	-1,03
A_24_P288993	LOC402175	hypothetical gene supported by AF044957; NM_004547; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa	-1,03
A_23_P257144	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	-1,03
A_23_P114839	FHL3	four and a half LIM domains 3	-1,03
A_24_P615462			-1,03
A_23_P23194	PINK1	PTEN induced putative kinase 1	-1,03
A_23_P133543	KLHL3	kelch-like 3 (Drosophila)	-1,03
A_24_P75008	LOC346329	similar to guanine nucleotide binding protein, alpha 11	-1,03
A_24_P193295	RAB15	RAB15, member RAS oncogene family	-1,03
A_23_P201386	DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	-1,03
A_23_P123848	DAB2IP	DAB2 interacting protein	-1,03
A_23_P393425	PAPD4	PAP associated domain containing 4	-1,03
A_24_P186764			-1,03
A_23_P207939	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1 mannosidase, alpha, class 1C, member 1	-1,03
A_24_P237778	MAN1C1		-1,03
A_23_P27649	ZNF433	zinc finger protein 433	-1,03
A_24_P25137	CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	-1,03
A_23_P58796	RGMB	RGM domain family, member B	-1,03
A_23_P81399	SQSTM1	sequestosome 1	-1,04
A_23_P18017	CPA3	carboxypeptidase A3 (mast cell)	-1,04
A_23_P70060	PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A	-1,04
A_32_P3385	FLJ37798	hypothetical gene supported by AK095117	-1,04

A_23_P43276	GPR124	G protein-coupled receptor 124	-1,04
A_24_P341279	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	-1,04
A_23_P335452	ZCCHC24	zinc finger, CCHC domain containing 24	-1,04
A_23_P432583	OAZ3	ornithine decarboxylase antizyme 3	-1,04
A_24_P358305			-1,04
A_23_P151870	GLCE	glucuronic acid epimerase	-1,04
A_32_P40288	TMEM200A	transmembrane protein 200A	-1,04
A_23_P391906	TMEM200A	transmembrane protein 200A	-1,04
A_24_P89971	SURF4	surfeit 4	-1,04
A_23_P344973	MYL6	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-1,04
A_24_P68222	CD99P1	CD99 molecule pseudogene 1	-1,04
A_24_P354523	AIMP1	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	-1,04
A_23_P133582	ETF1	eukaryotic translation termination factor 1	-1,04
A_23_P14184	THSD1	thrombospondin, type I, domain containing 1	-1,04
A_24_P313186	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	-1,04
A_23_P170733	ANTXR2	anthrax toxin receptor 2	-1,04
A_23_P50426	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2	-1,04
A_32_P32722	LOC729678	hypothetical protein LOC729678	-1,04
A_23_P99920	HACD3	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	-1,04
A_23_P70719	LAMA2	laminin, alpha 2	-1,04
A_24_P153803	RHOJ	ras homolog gene family, member J	-1,04
A_24_P377144	ANTXR2	anthrax toxin receptor 2	-1,05
A_24_P316939	LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	-1,05
A_23_P361014	TSHZ3	teashirt zinc finger homeobox 3	-1,05
A_24_P226970	ZNF365	zinc finger protein 365	-1,05
A_23_P316974	SYNJ2	synaptojanin 2	-1,05
A_24_P37519	LZTFL1	leucine zipper transcription factor-like 1	-1,05
A_23_P74359	CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1	-1,05
A_23_P215459	ELN	elastin	-1,05
A_24_P260582	TRIM52	tripartite motif-containing 52	-1,05
A_24_P192840			-1,05
A_24_P920319	ZBED5	zinc finger BED-type containing 5	-1,05

A_23_P147245	OSBPL10	oxysterol binding protein-like 10	-1,05
A_23_P89343	SNX11	sorting nexin 11	-1,05
A_23_P14124	RASL11A	RAS-like, family 11, member A	-1,05
A_24_P646168			-1,05
A_24_P220485	OLFML2A	olfactomedin-like 2A	-1,05
A_23_P58390	C4orf32	chromosome 4 open reading frame 32	-1,05
A_24_P186065	DHFRL1	dihydrofolate reductase-like 1	-1,05
A_24_P11791	KPNA4	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	-1,06
A_23_P55107	ULK2	unc-51-like kinase 2 (C. elegans)	-1,06
A_23_P2831	EDNRB	endothelin receptor type B	-1,06
A_24_P304760	SIN3A	SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)	-1,06
A_23_P206661	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	-1,06
A_24_P15765	RPS7P5	ribosomal protein S7 pseudogene 5	-1,06
A_24_P399980	HEPH	hephaestin	-1,06
A_32_P514599			-1,06
A_23_P70867	SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome	-1,06
A_23_P92025	CIDEA	cell death-inducing DFFA-like effector c	-1,06
A_24_P100673	TMEM85	transmembrane protein 85	-1,06
A_24_P69691	ZNF25	zinc finger protein 25	-1,06
A_23_P82990	OGN	osteoglycin	-1,06
A_23_P213944	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-1,06
A_23_P77859	TMEM88	transmembrane protein 88	-1,06
A_23_P77145	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	-1,06
A_23_P113777	ITGBL1	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	-1,06
A_23_P156880	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	-1,06
A_23_P134167	PDSS2	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 2	-1,06
A_23_P103765	FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	-1,06
A_23_P70020	PFDN1	prefoldin subunit 1	-1,06
A_24_P811014			-1,06
A_23_P4223	CALCOCO2	calcium binding and coiled-coil domain 2	-1,06
A_23_P212535	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B	-1,07

		PI-3-kinase-related kinase SMG-1	
A_24_P213487	SMG1P2	pseudogene	-1,07
A_32_P24832	OLFML3	olfactomedin-like 3	-1,07
		CCR4-NOT transcription complex,	
A_23_P112652	CNOT10	subunit 10	-1,07
A_23_P252283	RNF135	ring finger protein 135	-1,07
A_32_P220472	ZFAND6	zinc finger, AN1-type domain 6	-1,07
A_24_P538567			-1,07
		hypothetical gene supported by	
A_24_P92973	LOC400061	NM_014886	-1,07
A_23_P151267	LIMA1	LIM domain and actin binding 1	-1,07
		zinc finger and BTB domain containing	
A_23_P421638	ZBTB47	47	-1,07
A_24_P226554	ACTB	actin, beta	-1,07
A_23_P85004	DIAPH2	diaphanous homolog 2 (Drosophila)	-1,07
		zinc finger, FYVE domain containing	
A_24_P286054	ZFYVE16	16	-1,07
A_23_P132595	VGLL4	vestigial like 4 (Drosophila)	-1,07
		TAF9B RNA polymerase II, TATA box	
		binding protein (TBP)-associated	
A_24_P391431	TAF9B	factor, 31kDa	-1,07
A_23_P258582	GK5	glycerol kinase 5 (putative)	-1,07
A_24_P6903	ACTBL2	actin, beta-like 2	-1,07
A_24_P566701	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	-1,08
A_24_P393312	KIRREL	kin of IRRE like (Drosophila)	-1,08
A_23_P30275	PCYOX1L	prenylcysteine oxidase 1 like	-1,08
A_23_P415401	KLF9	Kruppel-like factor 9	-1,08
A_32_P123168	MYO9A	myosin IXA	-1,08
A_23_P213966	TIGD6	tigger transposable element derived 6	-1,08
A_24_P117866	ADD1	adducin 1 (alpha)	-1,08
A_24_P76210			-1,08
		non-SMC element 1 homolog (S.	
A_23_P95823	NSMCE1	cerevisiae)	-1,08
A_24_P298834	RPL32P10	ribosomal protein L32 pseudogene 10	-1,08
A_24_P917457			-1,08
A_24_P229766			-1,08
		syncoilin, intermediate filament	
A_23_P96965	SYNC	protein	-1,08
A_23_P50535	DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase	-1,08
		StAR-related lipid transfer (START)	
A_23_P387630	STARD8	domain containing 8	-1,08

A_32_P56525	FAM115A	family with sequence similarity 115, member A	-1,08
A_23_P212728	TBC1D23	TBC1 domain family, member 23	-1,08
A_23_P51397	ENAH	enabled homolog (Drosophila)	-1,08
A_24_P83544	TCEB1P3	transcription elongation factor B subunit 1 pseudogene 3	-1,08
A_23_P381577	ZNF25	zinc finger protein 25	-1,08
A_23_P6891	EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B	-1,08
A_24_P592012	ZBTB46	zinc finger and BTB domain containing 46	-1,08
A_23_P318420	CTTNBP2NL	CTTNBP2 N-terminal like	-1,09
A_23_P348383	CC2D2A	coiled-coil and C2 domain containing 2A	-1,09
A_24_P381555	SAP18	Sin3A-associated protein, 18kDa	-1,09
A_23_P140648	CYFIP1	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	-1,09
A_24_P497244	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	-1,09
A_23_P45106	QRICH1	glutamine-rich 1	-1,09
A_32_P14610	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	-1,09
A_24_P11315	OLFML3	olfactomedin-like 3	-1,09
A_23_P502343	ADAM33	ADAM metallopeptidase domain 33	-1,09
A_24_P253676			-1,09
A_23_P212768	ADD1	adducin 1 (alpha)	-1,09
A_32_P192376	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	-1,09
A_24_P56130	MYL6	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-1,09
A_23_P128230	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	-1,09
A_23_P118705	SDF2	stromal cell-derived factor 2	-1,09
A_24_P290585	UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	-1,09
A_23_P94889	FAM82B	family with sequence similarity 82, member B	-1,09
A_23_P383910	KIAA1191	KIAA1191	-1,09
A_24_P173754	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21	-1,10
A_24_P931944	PARVA	parvin alpha	-1,10
A_23_P58622	UBE2D2	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	-1,10

A_24_P113926	DPT	dermatopontin	-1,10
		potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	
A_23_P19142	KCNMB1		-1,10
A_23_P500364	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B	-1,10
A_23_P8185	DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	-1,10
A_23_P93442	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	-1,10
		sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	
A_23_P256473	SEMA3C		-1,10
A_23_P39237	ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	-1,10
		ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	
A_24_P102203	UBR1		-1,10
A_23_P163455	MAP1A	microtubule-associated protein 1A	-1,10
A_23_P385206	STX12	syntaxin 12	-1,10
		family with sequence similarity 36, member A	
A_24_P79712	FAM36A		-1,10
		Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	
A_24_P929570	RAPH1		-1,10
A_24_P388810	SRP19	signal recognition particle 19kDa	-1,10
		bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	
A_24_P753161	BMPR2		-1,10
A_23_P137909	HIST3H3	histone cluster 3, H3	-1,10
A_24_P86993	JAM3	junctional adhesion molecule 3	-1,10
		LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	
A_24_P114551	LPP		-1,10
		dual specificity phosphatase 27 (putative)	
A_23_P423012	DUSP27		-1,10
A_24_P179044	SNX9	sorting nexin 9	-1,10
		ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	
A_23_P315892	ST6GALNAC6		-1,11
A_24_P46689	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	-1,11
A_24_P47467	TMEM109	transmembrane protein 109	-1,11
		patatin-like phospholipase domain containing 4	
A_24_P943815	PNPLA4		-1,11
		FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5	
A_23_P258151	FGD5		-1,11
		B-cell CLL/lymphoma 6, member B (zinc finger protein)	
A_23_P324813	BCL6B		-1,11

A_24_P205874	SEC22C	SEC22 vesicle trafficking protein homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,11
A_24_P71700	ZBTB47	zinc finger and BTB domain containing 47	-1,11
A_24_P368023	TCAF1	TRPM8 channel associated factor 1	-1,11
A_23_P251611	TBC1D9B	TBC1 domain family, member 9B (with GRAM domain)	-1,11
A_24_P333857	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1	-1,11
A_24_P796652	RBPJP7	RBPJ pseudogene 7	-1,11
A_23_P210425	MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	-1,11
A_24_P277349	SEC31A	SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,11
A_23_P429082	SPTY2D1	SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,11
A_23_P391586	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-1,11
A_24_P484797	CIDCEP	cell death-inducing DFFA-like effector c pseudogene	-1,11
A_24_P19544	STK39	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)	-1,11
A_23_P21976	CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	-1,11
A_32_P38426	C10orf46	chromosome 10 open reading frame 46	-1,12
A_24_P358205			-1,12
A_23_P41512	HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3	-1,12
A_24_P143171	TMEM47	transmembrane protein 47	-1,12
A_23_P206018	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-1,12
A_23_P141055	TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	-1,12
A_23_P214789	SNX9	sorting nexin 9	-1,12
A_23_P16953	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	-1,12
A_23_P14957	CDR2	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	-1,12
A_23_P124084	LOXL1	lysyl oxidase-like 1	-1,12
A_23_P144827	FBXL7	F-box and leucine-rich repeat protein 7	-1,12
A_24_P111912	FAM172A	family with sequence similarity 172, member A	-1,12
A_24_P414952	TMEM168	transmembrane protein 168	-1,12
A_23_P133656	LAMA4	laminin, alpha 4	-1,13
A_24_P315256			-1,13
A_24_P944827	ATG7	ATG7 autophagy related 7 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,13

A_32_P188860	IL17RD	interleukin 17 receptor D	-1,13
A_24_P398972	COQ7	coenzyme Q7 homolog, ubiquinone (yeast)	-1,13
A_23_P121011	CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	-1,13
A_32_P137075	KIAA1217	Homo sapiens KIAA1217 (KIAA1217)	-1,13
A_23_P256432	PPP2R5A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha isoform	-1,13
A_24_P291978	ADCK2	aarF domain containing kinase 2	-1,13
A_23_P63908	TRUB1	TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1 (E. coli)	-1,13
A_23_P212436	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	-1,14
A_23_P205910	SLC24A1	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	-1,14
A_23_P211806	LRRFIP2	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 2	-1,14
A_23_P213562	F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	-1,14
A_24_P560909	RNF115	ring finger protein 115	-1,14
A_23_P258972	GOLGA1	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1	-1,14
A_24_P362850	PBRM1	polybromo 1	-1,14
A_32_P140656	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	-1,14
A_23_P30614	PLN	phospholamban	-1,14
A_23_P206140	DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	-1,14
A_24_P296508	SLC43A2	solute carrier family 43, member 2	-1,14
A_23_P21618	PDZRN3	PDZ domain containing ring finger 3	-1,14
A_32_P65371			-1,14
A_23_P5550	PUM2	pumilio homolog 2 (Drosophila)	-1,14
A_23_P102364	NGEF	neuronal guanine nucleotide exchange factor	-1,14
A_23_P53623	P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	-1,14
A_24_P227993	UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)	-1,14
A_23_P61854	TTC37	tetratricopeptide repeat domain 37	-1,14
A_24_P409971	NEXN	nexilin (F actin binding protein)	-1,14
A_24_P608330	CTNNB1	Catenin beta 1	-1,14

A_23_P426305	AOC3	amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	-1,14
A_24_P131752	DLG1	discs, large homolog 1 (Drosophila)	-1,14
A_24_P244800	NDRG2	NDRG family member 2	-1,14
A_24_P925505	CD36	CD36=collagen type I/thrombospondin receptor {one exon} [human, mRNA Partial, 369 nt]. [S67044]	-1,14
A_23_P382065	EMCN	endomucin	-1,14
A_23_P48217	APOLD1	apolipoprotein L domain containing 1	-1,15
A_24_P191971	SAP30L	SAP30-like	-1,15
A_23_P83277	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	-1,15
A_24_P351420	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3	-1,15
A_24_P85181	ZFYVE20	zinc finger, FYVE domain containing 20	-1,15
A_24_P160874	DUT	deoxyuridine triphosphatase	-1,15
A_23_P73239	NCKAP1	NCK-associated protein 1	-1,15
A_23_P329353	CNRIP1	cannabinoid receptor interacting protein 1	-1,15
A_24_P587803			-1,15
A_32_P226907	LOC284112	Homo sapiens cDNA FLJ25640 fis, clone STM04823. [AK098506]	-1,15
A_24_P178106	YTHDC2	YTH domain containing 2	-1,15
A_23_P326319	C16orf45	chromosome 16 open reading frame 45	-1,16
A_24_P152188	PRICKLE2	prickle homolog 2 (Drosophila)	-1,16
A_23_P73457	RUFY1	RUN and FYVE domain containing 1	-1,16
A_24_P801197	LOC283788	FSHD region gene 1 pseudogene	-1,16
A_24_P419211	MTMR6	myotubularin related protein 6	-1,16
A_24_P643776			-1,16
A_23_P26124	RORA	RAR-related orphan receptor A	-1,16
A_24_P658584	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	-1,16
A_32_P169179	MSX2P1	msh homeobox 2 pseudogene 1	-1,16
A_23_P212339	FYCO1	FYVE and coiled-coil domain containing 1	-1,16
A_24_P123632			-1,16
A_23_P77228	CRTC3	CREB regulated transcription coactivator 3	-1,16
A_23_P100602	TBCD	tubulin folding cofactor D	-1,16
A_23_P213551	CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	-1,17
A_23_P144896	PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	-1,17
A_24_P225719	MOBK3	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 3 (yeast)	-1,17

A_23_P7337	EDNRA	endothelin receptor type A	-1,17
A_32_P6139	C4orf19	chromosome 4 open reading frame 19	-1,17
A_24_P334005	C1orf123	chromosome 1 open reading frame 123	-1,17
A_23_P212475	SHISA5	shisa homolog 5 (<i>Xenopus laevis</i>)	-1,17
A_23_P53390	PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-1,17
A_23_P303671	ECM2	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific	-1,17
A_23_P73801	TCEAL1	transcription elongation factor A (SII)-like 1	-1,17
A_24_P75708	LOC390996	cofilin 1 pseudogene 6	-1,17
A_23_P42575	CALD1	caldesmon 1	-1,17
A_23_P160318	COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	-1,17
A_32_P74206	LOC400707	uncharacterized LOC400707	-1,17
A_23_P54953	SAP30BP	SAP30 binding protein	-1,18
A_24_P140608	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-1,18
A_23_P52552	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	-1,18
A_32_P56001	CD93	CD93 molecule	-1,18
A_24_P641673			-1,18
A_24_P23411	ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3	-1,18
A_23_P69491	RHOA	ras homolog gene family, member A	-1,18
A_32_P164477	GLIPR2	GLI pathogenesis related 2	-1,18
A_24_P230675	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-1,18
A_24_P237686			-1,18
A_23_P204979	MBNL2	muscleblind-like 2 (<i>Drosophila</i>)	-1,19
A_23_P46045	RGS5	regulator of G-protein signaling 5	-1,19
A_32_P81149	RPL14	ribosomal protein L14	-1,19
A_23_P62901	BTG2	BTG family, member 2	-1,19
A_24_P273726	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	-1,19
A_23_P27724	SEPW1	selenoprotein W, 1	-1,19
A_23_P216429	ASPN	asporin	-1,19
A_24_P191781	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	-1,19
A_23_P18692	ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-1,19
A_32_P213418	PLN	phospholamban	-1,19
A_24_P355267	SLC25A25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	-1,19

A_23_P57323	ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)	-1,20
A_24_P283395	ADCK2	aarF domain containing kinase 2	-1,20
A_23_P251945	DCTN4	dynactin 4 (p62)	-1,20
A_24_P75879	SEPT7P2	septin 7 pseudogene 2	-1,20
A_24_P357465	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	-1,20
A_24_P358245	LOC158381	ATPase, Class I, type 8B family pseudogene	-1,20
A_24_P940149	C2CD2	C2 calcium-dependent domain containing 2	-1,20
A_23_P160559	ECM1	extracellular matrix protein 1	-1,21
A_24_P400760	LOC643454	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit pseudogene	-1,21
A_24_P937405	PRSS23	protease, serine, 23	-1,21
A_23_P119593	EPHX3	epoxide hydrolase 3	-1,21
A_23_P166663	APPL1	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1	-1,21
A_32_P70519	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	-1,21
A_23_P433188	GZF1	GDNF-inducible zinc finger protein 1	-1,21
A_23_P150053	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	-1,21
A_23_P303833	SCN4B	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta	-1,21
A_24_P362737	FOXP1	forkhead box P1	-1,21
A_23_P148297	SH3BGRL	SH3 domain binding glutamic acid- rich protein like	-1,22
A_24_P921366	CALD1	caldesmon 1	-1,22
A_24_P943781	C7orf58	chromosome 7 open reading frame 58	-1,22
A_24_P101271			-1,22
A_23_P410233	FILIP1	filamin A interacting protein 1	-1,22
A_23_P27584	MYADM	myeloid-associated differentiation marker	-1,22
A_23_P31124	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	-1,22
A_32_P68408	CSNK1A1P	casein kinase 1, alpha 1 pseudogene	-1,22
A_23_P164436	ASPA	aspartoacylase (Canavan disease)	-1,22
A_24_P214625	PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2	-1,22
A_23_P10902	FRZB	frizzled-related protein	-1,22
A_24_P410952	PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	-1,22

A_23_P110643	CDKL3	cyclin-dependent kinase-like 3	-1,23
A_23_P24555	PHLDB1	pleckstrin homology-like domain, family B, member 1	-1,23
A_23_P163408	SCAPER	S-phase cyclin A-associated protein in the ER	-1,23
A_23_P253350	C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	-1,23
A_23_P211985	SNRK	SNF related kinase	-1,23
A_24_P930796	C10orf72	chromosome 10 open reading frame 72	-1,23
A_23_P201790	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	-1,23
A_24_P326511	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	-1,23
A_23_P215406	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	-1,23
A_24_P375599			-1,23
A_23_P152028	TRIP4	thyroid hormone receptor interactor 4	-1,23
A_23_P105144	SCUBE2	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2	-1,23
A_24_P583007	FGD5-AS1	FGD5 antisense RNA 1	-1,23
A_23_P12514	RHOC	ras homolog gene family, member C	-1,23
A_23_P202594	C10orf119	chromosome 10 open reading frame 119	-1,24
A_32_P64928	LOC100287016	similar to destrin	-1,24
A_23_P127911	PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	-1,24
A_23_P20566	TPM2	tropomyosin 2 (beta)	-1,24
A_23_P257043	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	-1,24
A_24_P175059	ATG5	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	-1,24
A_23_P126706	ANGPTL1	angiopoietin-like 1	-1,24
A_24_P367329	LOC440292	similar to COMM domain containing 4	-1,25
A_24_P375237	RPL12	ribosomal protein L12	-1,25
A_24_P252575	RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	-1,25
A_23_P32233	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	-1,25
A_24_P191664	GOLIM4	golgi integral membrane protein 4	-1,25
A_32_P128701	USP53	ubiquitin specific peptidase 53	-1,25
A_23_P309865	ZNF449	zinc finger protein 449	-1,25
A_23_P217088	AK1	adenylate kinase 1	-1,25
A_23_P19663	CTGF	connective tissue growth factor	-1,25
A_23_P43283	GPR124	G protein-coupled receptor 124	-1,26

A_23_P135437	EXOC4	exocyst complex component 4	-1,26
A_23_P144005	C3orf32	chromosome 3 open reading frame 32	-1,26
A_23_P209669	NRP2	neuropilin 2	-1,26
A_32_P183022	ENAH	enabled homolog (Drosophila) FBJ murine osteosarcoma viral	-1,26
A_23_P429998	FOSB	oncogene homolog B	-1,26
A_32_P142991	PRKAR2A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	-1,26
A_23_P423543	REEP3	receptor accessory protein 3	-1,26
A_23_P37205	NDRG2	NDRG family member 2	-1,26
A_24_P98249	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	-1,26
A_23_P155848	DKK2	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis) uveal autoantigen with coiled-coil	-1,26
A_23_P360340	UACA	domains and ankyrin repeats	-1,26
A_23_P53193	SYTL2	synaptotagmin-like 2	-1,26
A_23_P163458	EHD4	EH-domain containing 4	-1,26
A_23_P148204	USP47	ubiquitin specific peptidase 47	-1,26
A_24_P408424	MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	-1,27
A_24_P69654	KLF6	Kruppel-like factor 6	-1,27
A_24_P150580	RASL12	RAS-like, family 12	-1,27
A_23_P414273	C5orf62	chromosome 5 open reading frame 62	-1,27
A_23_P112554	COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	-1,27
A_32_P100974	RPL24	ribosomal protein L24	-1,27
A_32_P18251	FUNDC2	FUN14 domain containing 2	-1,27
A_32_P220798	CD34	CD34 molecule	-1,27
A_24_P329795	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	-1,27
A_24_P330773	CALCOCO2	calcium binding and coiled-coil domain 2	-1,28
A_24_P59220	POTEF	POTE ankyrin domain family, member F	-1,28
A_23_P423695	MXD4	MAX dimerization protein 4	-1,28
A_23_P310094	SYNPO2	synaptopodin 2	-1,28
A_24_P251534	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	-1,28
A_23_P93780	HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	-1,28
A_23_P102706	SNPH	syntaphilin	-1,28
A_23_P256334	ITGA1	integrin, alpha 1	-1,28
A_24_P278192	AK1	adenylate kinase 1	-1,29

A_23_P155989	CENPK	centromere protein K	-1,29
A_23_P316012	RHOJ	ras homolog gene family, member J	-1,29
A_23_P51518	RGS5	regulator of G-protein signaling 5	-1,29
A_24_P366656	SH3D19	SH3 domain containing 19	-1,29
A_24_P233786	FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	-1,29
A_24_P943613	TBC1D1	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1	-1,29
A_24_P497437	LOC283788	FSHD region gene 1 pseudogene	-1,29
A_23_P363778	FRZB	frizzled-related protein	-1,29
A_24_P867111	LOC283177	hypothetical protein LOC283177	-1,29
A_23_P355295	FMO2	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	-1,30
A_23_P213102	PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein	-1,30
A_32_P19840			-1,30
A_23_P79360	NOSTRIN	nitric oxide synthase trafficker	-1,30
A_24_P315120	COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	-1,30
A_23_P107257	SPOP	speckle-type POZ protein	-1,30
A_23_P373819	TUSC1	tumor suppressor candidate 1	-1,30
A_23_P90062	DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	-1,31
A_32_P167239	AFAP1L1	actin filament associated protein 1-like 1	-1,31
A_24_P126890	RPL9	ribosomal protein L9	-1,31
A_24_P916965	ITGBL1	integrin subunit beta like 1	-1,31
A_23_P132536	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	-1,32
A_23_P154740	PLK1S1	polo-like kinase 1 substrate 1	-1,32
A_24_P90774	UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	-1,32
A_23_P67299	DOCK6	dedicator of cytokinesis 6	-1,32
A_24_P943802	SEC31A	SEC31 homolog A (S. cerevisiae)	-1,32
A_24_P401321			-1,32
A_23_P144807		08-sep septin 8	-1,32
A_23_P17152			-1,33
A_23_P87013	TAGLN	transgelin	-1,33
A_24_P134955	PPP2R5A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha isoform	-1,33
A_24_P217572	EDNRA	endothelin receptor type A	-1,33
A_23_P6746	IQSEC1	IQ motif and Sec7 domain 1	-1,34
A_32_P7721	RORA	RAR-related orphan receptor A	-1,34

A_32_P133884	TUSC1	tumor suppressor candidate 1	-1,34
A_24_P168925	CHRDL1	chordin-like 1	-1,34
A_23_P23017	C1orf123	chromosome 1 open reading frame 123	-1,34
A_24_P124370	PARVA	parvin, alpha	-1,35
A_23_P211816	MAP4	microtubule-associated protein 4	-1,35
A_23_P72387	AFAP1	actin filament associated protein 1	-1,35
A_23_P250930	CRBN	cereblon	-1,35
A_23_P86461	PLAC9	placenta-specific 9	-1,35
A_32_P43349	LOC400456	hypothetical protein LOC400456	-1,35
A_24_P84408			-1,36
A_23_P431933	CAMKK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha	-1,36
A_23_P13740	NAV3	neuron navigator 3	-1,36
A_24_P39101	KCTD10	potassium channel tetramerisation domain containing 10	-1,36
A_32_P213521	EMCN	endomucin	-1,37
A_23_P395365	ENTPD2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	-1,37
A_24_P270890	SPOP	speckle-type POZ protein	-1,37
A_32_P57717	LRRFIP1	Homo sapiens leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1 (LRRFIP1)	-1,37
A_23_P310022	KIAA1217	KIAA1217	-1,37
A_24_P233917	KIAA0494	KIAA0494	-1,37
A_23_P33364	SH3D19	SH3 domain containing 19	-1,37
A_23_P51548	MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3	-1,38
A_32_P193218	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	-1,38
A_24_P324787	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2	-1,38
A_23_P342654	PALM2-AKAP2	PALM2-AKAP2 readthrough transcript	-1,38
A_24_P250964	PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	-1,38
A_23_P53081	OSBPL5	oxysterol binding protein-like 5	-1,38
A_23_P128384	VPS29	vacuolar protein sorting 29 homolog (S. cerevisiae)	-1,39
A_24_P212389	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	-1,40
A_24_P225907	DPH3	DPH3, KTI11 homolog (S. cerevisiae)	-1,40
A_23_P423309	PCDH12	protocadherin 12	-1,40
A_23_P103672	NES	nestin	-1,40
A_32_P191285			-1,40

A_24_P375949	RPSAP11	ribosomal protein SA pseudogene 11	-1,41
A_24_P15823			-1,41
A_23_P134041	TBX18	T-box 18	-1,41
A_24_P408981			-1,41
A_23_P125788	TCEAL7	transcription elongation factor A (SII)-like 7	-1,41
A_24_P206121	KCNMB1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	-1,41
A_32_P230736	LOC389033	placenta-specific 9 pseudogene	-1,41
A_24_P690235			-1,41
A_24_P925422			-1,42
A_23_P301304	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	-1,42
A_23_P6688	ANO10	anoctamin 10	-1,42
A_24_P832426	B3GALTL	beta 1,3-galactosyltransferase-like	-1,42
A_23_P63798	KLF6	Kruppel-like factor 6	-1,42
A_23_P217428	ARHGAP6	Rho GTPase activating protein 6	-1,42
A_23_P167017	POPDC2	popeye domain containing 2	-1,43
A_24_P101248	PARD3B	par-3 family cell polarity regulator beta	-1,43
A_24_P727868	LOC728003	similar to vesicle-associated membrane protein-associated protein A	-1,43
A_23_P211973	NEK11	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 11	-1,43
A_23_P502913	WDR1	WD repeat domain 1	-1,44
A_24_P385280	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	-1,44
A_23_P37910	MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	-1,44
A_23_P408363	ITGBL1	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	-1,45
A_23_P129144	GCOM1	GRINL1A complex locus	-1,45
A_23_P218858	ABI3BP	ABI family, member 3 (NESH) binding protein	-1,45
A_23_P34915	ATF3	activating transcription factor 3	-1,47
A_23_P10506	HPGDS	hematopoietic prostaglandin D synthase	-1,47
A_23_P349083	FCHO2	FCH domain only 2	-1,47
A_23_P420361	C3orf10	chromosome 3 open reading frame 10	-1,48
A_23_P201940	LMOD1	leiomodoin 1 (smooth muscle)	-1,48
A_24_P317907	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	-1,49
A_23_P21907			-1,49
A_24_P256603	LYRM7	Lyrm7 homolog (mouse)	-1,49

A_23_P200928	NID1	nidogen 1	-1,49
A_23_P301521	KIAA1462	KIAA1462	-1,50
A_24_P410797	KALRN	kalirin, RhoGEF kinase	-1,50
A_32_P221452	RABL3	RAB, member of RAS oncogene family-like 3	-1,50
A_24_P109652	SGK269	NKF3 kinase family member	-1,50
A_24_P174641	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	-1,51
A_23_P217832	FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	-1,52
A_23_P58647	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	-1,52
A_24_P272313	C2orf55	chromosome 2 open reading frame 55	-1,53
A_32_P112592	LOC339524	hypothetical LOC339524	-1,55
A_23_P213000	WDR1	WD repeat domain 1	-1,55
A_24_P247175			-1,56
A_24_P942773	SLMAP	sarcolemma associated protein	-1,57
A_32_P118586	FAM116A	family with sequence similarity 116, member A	-1,59
A_32_P218228	FAM109B	family with sequence similarity 109, member B	-1,62
A_24_P33895	ATF3	activating transcription factor 3	-1,62
A_24_P47182	VCL	vinculin	-1,64
A_24_P105933	VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	-1,66
A_32_P89709	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-1,66
A_23_P24215	TBC1D12	TBC1 domain family, member 12	-1,72
A_23_P408095	DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)	-1,72
A_24_P53150	TRAF7	TNF receptor-associated factor 7	-1,73
A_32_P198731	NEURL1B	neutralized homolog 1B (Drosophila)	-1,74
A_23_P502915	WDR1	WD repeat domain 1	-1,79
A_24_P174367	PPP1R2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	-1,81
A_24_P945194	PDCD6IP	programmed cell death 6 interacting protein	-1,82
A_23_P71316	RBPM5	RNA binding protein with multiple splicing	-1,83
A_24_P26897	INPP5A	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	-1,84
A_23_P92903	C1QTNF2	C1q and tumor necrosis factor related protein 2	-1,85
A_23_P92899	C1QTNF2	C1q and tumor necrosis factor related protein 2	-1,91

A_23_P415827	08-sep septin 8	-2,14
--------------	-----------------	-------

(*) 62 sondas sin símbolo asociado, ni denominación.

8.2 ANEXO 2. RESULTADO DEL COMANDO `SESSIONINFO()` EN R VERSIÓN 3.2.5 CON TODAS LAS LIBRERÍAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ESTE ESTUDIO.

R version 3.2.5 (2016-04-14)
 Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit)
 Running under: Windows 7 (build 7601) Service Pack 1

locale:

[1] LC_COLLATE=English_United States.1252
 [2] LC_CTYPE=English_United States.1252
 [3] LC_MONETARY=English_United States.1252
 [4] LC_NUMERIC=C
 [5] LC_TIME=English_United States.1252

attached base packages:

[1] parallel stats4 stats graphics grDevices utils datasets
 [8] methods base

other attached packages:

[1] repmis_0.5 knitr_1.13 kernlab_0.9-24
 [4] randomForest_4.6-1 pls_2.5-0 caret_6.0-70
 [7] ggplot2_2.1.0 lattice_0.20-33 genefilter_1.52.1
 [10] superpc_1.09 survival_2.38-3 hgug4112a.db_3.2.2
 [13] org.Hs.eg.db_3.2.3 RSQLite_1.0.0 DBI_0.4-1
 [16] AnnotationDbi_1.32.3 IRanges_2.4.8 S4Vectors_0.8.11
 [19] Biobase_2.30.0 BiocGenerics_0.16.1 limma_3.26.9

loaded via a namespace (and not attached):

[1] minqa_1.2.4 stringr_1.0.0 pbkrtest_0.4-6 SparseM_1.7
 [5] xtable_1.8-2 Rcpp_0.12.5 httr_1.2.1 car_2.1-2
 [9] plyr_1.8.4 R.utils_2.3.0 tools_3.2.5 MASS_7.3-45
 [13] nlme_3.1-125 annotate_1.48.0 R6_2.1.2 R.methodsS3_1.7.1
 [17] scales_0.4.0 MatrixModels_0.4-1 digest_0.6.9 nnet_7.3-12
 [21] lme4_1.1-12 gtable_0.2.0 Matrix_1.2-4 foreach_1.4.3
 [25] stringi_1.1.1 reshape2_1.4.1 munsell_0.4.3 grid_3.2.5
 [29] XML_3.98-1.4 data.table_1.9.6 colorspace_1.2-6 R.oo_1.20.0
 [33] quantreg_5.26 nloptr_1.0.4 magrittr_1.5 splines_3.2.5
 [37] mgcv_1.8-12 iterators_1.0.8 codetools_0.2-14 R.cache_0.12.0
 [41] chron_2.3-47

8.3 ANEXO 3. AUTORES DEL SOFTWARE RELACIONADO CON EL ENTORNO ESTADÍSTICO R USADO EN ESTE ESTUDIO.

[1] Eric Bair and R. Tibshirani. *superpc: Supervised principal components*, 2012. R package version 1.09.

[2] Leo Breiman, Adele Cutler, Andy Liaw, and Matthew Wiener. *randomForest: Breiman and Cutler's Random Forests for Classification and Regression*, 2015. R package version 4.6-12.

[3] Marc Carlson. *hgug4112a.db: Agilent "Human Genome, Whole" annotation data (chip hgug4112a)*, 2016. R package version 3.2.2.

[4] Max Kuhn. Contributions from Jed Wing, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefer, Allan Engelhardt, Tony Cooper, Zachary Mayer, Brenton Kenkel, the R Core Team, Michael Benesty, Reynald Lescarbeau, Andrew Ziem, Luca Scrucca, Yuan Tang, and Can Candan. *caret: Classification and Regression Training*, 2016. R package version 6.0-70.

[5] Christopher Gandrud. *repmis: Miscellaneous Tools for Reproducible Research*, 2016. R package version 0.5.

[6] R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, and F. Hahne. *genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments*, 2016. R package version 1.52.1.

[7] R. Gentleman, V. Carey, M. Morgan, and S. Falcon. *Biobase: Base functions for Bioconductor*, 2016. R package version 2.30.0.

[8] Alexandros Karatzoglou, Alex Smola, and Kurt Hornik. *kernlab: Kernel-Based Machine Learning Lab*, 2016. R package version 0.9-24.

[9] Bjrn-Helge Mevik, Ron Wehrens, and Kristian Hovde Liland. *pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression*, 2015. R package version 2.5-0.

[10] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. Version 3.2.5.

[11] Gordon Smyth, Matthew Ritchie, Jeremy Silver, James Wettenhall, Natalie Thorne, Davis McCarthy, Di Wu, Yifang Hu, Wei Shi, Belinda Phipson, Alicia Oshlack, Carolyn de Graaf, Mette Langaas, Egil Ferkingstad, Marcus Davy, Francois Pepin, Dongseok Choi, and Aaron Lun. *limma: Linear Models for Microarray Data*, 2016. R package version 3.26.9.

8.4 ANEXO 4. LISTADO COMPLETO DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS MÁS SOBRREREPRERENTADOS ESTADÍSTICAMENTE ENTRE LOS GENES SELECCIONADOS PARA LA GENERACIÓN DEL MODELO SEGÚN APARECEN EN *DAVID BIOINFORMATICS RESOURCES 6.7*.

Procesos biológicos de los genes correlacionados positivamente con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0006396~RNA processing	10.3	1.87E-08	0.000
GO:0022613~ribonucleoprotein complex biogénesis.	4.8	1.09E-05	0.007
GO:0034470~ncRNA processing	4.4	8.05E-05	0.036
GO:0034660~ncRNA metabolic process	4.8	1.21E-04	0.040
GO:0046148~pigment biosynthetic process	2.2	2.23E-04	0.059
GO:0008380~RNA splicing	5.1	2.32E-04	0.051
GO:0016071~mRNA metabolic process	5.9	2.91E-04	0.055
GO:0018279~protein amino acid N-linked glycosylation via asparagine	1.5	3.24E-04	0.054
GO:0018196~peptidyl-asparagine modification	1.5	3.24E-04	0.054
GO:0042254~ribosome biogenesis	3.3	3.70E-04	0.055
GO:0042440~pigment metabolic process	2.2	4.42E-04	0.058
GO:0006397~mRNA processing	5.1	7.42E-04	0.088
GO:0009101~glycoprotein biosynthetic process	3.3	0.002	0.203
GO:0070085~glycosylation	2.9	0.002	0.228
GO:0006486~protein amino acid glycosylation	2.9	0.002	0.228
GO:0043413~biopolymer glycosylation	2.9	0.002	0.228
GO:0065003~macromolecular complex assembly	7.4	0.003	0.273
GO:0006487~protein amino acid N-linked glycosylation	1.8	0.004	0.277
GO:0008033~tRNA processing	2.2	0.005	0.329
GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions	2.9	0.007	0.409
GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome	2.9	0.007	0.409

GO:0000377~RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	2.9	0.007	0.409
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	7.4	0.007	0.393
GO:0022403~cell cycle phase	5.1	0.007	0.386
GO:0006399~tRNA metabolic process	2.6	0.007	0.382
GO:0000279~M phase	4.4	0.008	0.404
GO:0007049~cell cycle	7.7	0.008	0.391
GO:0009100~glycoprotein metabolic process	3.3	0.009	0.406
GO:0006364~rRNA processing	2.2	0.010	0.447
GO:0050866~negative regulation of cell activation	1.8	0.011	0.463
GO:0016072~rRNA metabolic process	2.2	0.012	0.478
GO:0051235~maintenance of location	1.8	0.013	0.493
GO:0046112~nucleobase biosynthetic process	1.1	0.017	0.558
GO:0022618~ribonucleoprotein complex assembly	1.8	0.017	0.558
GO:0006310~DNA recombination	2.2	0.018	0.553
GO:0016052~carbohydrate catabolic process	2.2	0.020	0.594
GO:0006400~tRNA modification	1.1	0.022	0.604
GO:0006783~heme biosynthetic process	1.1	0.024	0.636
GO:0006351~transcription, DNA-dependent	3.7	0.025	0.639
GO:0009303~rRNA transcription	1.1	0.027	0.655
GO:0032774~RNA biosynthetic process	3.7	0.027	0.647
GO:0006494~protein amino acid terminal glycosylation	0.7	0.028	0.655
GO:0006496~protein amino acid terminal N-glycosylation	0.7	0.028	0.655
GO:0006096~glycolysis	1.5	0.030	0.661
GO:0009451~RNA modification	1.5	0.031	0.672
GO:0019882~antigen processing and presentation	1.8	0.031	0.662
GO:0033014~tetrapyrrole biosynthetic process	1.1	0.033	0.670
GO:0006779~porphyrin biosynthetic process	1.1	0.033	0.670

GO:0022402~cell cycle process	5.5	0.033	0.664
GO:0031570~DNA integrity checkpoint	1.5	0.038	0.711
GO:0043488~regulation of mRNA stability	1.1	0.039	0.710
GO:0042168~heme metabolic process	1.1	0.039	0.710
GO:0000280~nuclear division	2.9	0.039	0.704
GO:0007067~mitosis	2.9	0.039	0.704
GO:0000278~mitotic cell cycle	4.0	0.041	0.710
GO:0051250~negative regulation of lymphocyte activation	1.5	0.042	0.714
GO:0032784~regulation of RNA elongation	0.7	0.042	0.708
GO:0032786~positive regulation of RNA elongation	0.7	0.042	0.708
GO:0051208~sequestering of calcium ion	0.7	0.042	0.708
GO:0009156~ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	1.1	0.042	0.701
GO:0009112~nucleobase metabolic process	1.1	0.042	0.701
GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	2.9	0.043	0.694
GO:0043487~regulation of RNA stability	1.1	0.046	0.716
GO:0030433~ER-associated protein catabolic process	1.1	0.046	0.716
GO:0048285~organelle fission	2.9	0.047	0.719
GO:0002695~negative regulation of leukocyte activation	1.5	0.048	0.721
GO:0009161~ribonucleoside monophosphate metabolic process	1.1	0.049	0.722
GO:0006007~glucose catabolic process	1.5	0.050	0.723
GO:0051188~cofactor biosynthetic process	1.8	0.051	0.719
GO:0018130~heterocycle biosynthetic process	1.5	0.053	0.726
GO:0042127~regulation of cell proliferation	6.6	0.060	0.766
GO:0051329~interphase of mitotic cell cycle	1.8	0.061	0.765
GO:0051186~cofactor metabolic process	2.6	0.062	0.766
GO:0006778~porphyrin metabolic process	1.1	0.065	0.775
GO:0033013~tetrapyrrole metabolic process	1.1	0.065	0.775

GO:0051325~interphase	1.8	0.066	0.778
GO:0045578~negative regulation of B cell differentiation	0.7	0.070	0.791
GO:0019320~hexose catabolic process	1.5	0.077	0.817
GO:0000245~spliceosome assembly	1.1	0.077	0.812
GO:0006916~anti-apoptosis	2.6	0.078	0.812
GO:0002504~antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	1.1	0.081	0.820
GO:0006986~response to unfolded protein	1.5	0.082	0.820
GO:0046365~monosaccharide catabolic process	1.5	0.082	0.820
GO:0006189~'de novo' IMP biosynthetic process	0.7	0.083	0.820
GO:0046040~IMP metabolic process	0.7	0.083	0.820
GO:0045039~protein import into mitochondrial inner membrane	0.7	0.083	0.820
GO:0006188~IMP biosynthetic process	0.7	0.083	0.820
GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly	3.3	0.088	0.833
GO:0051338~regulation of transferase activity	3.7	0.088	0.831
GO:0051276~chromosome organization	4.4	0.090	0.832
GO:0007585~respiratory gaseous exchange	1.1	0.094	0.842
GO:0051238~sequestering of metal ion	0.7	0.096	0.845

Procesos biológicos de los genes correlacionados negativamente con el SUV.

Term	%	PValue	Benjamini
GO:0007160~cell-matrix adhesion	2.9	9.20E-07	0.002
GO:0031589~cell-substrate adhesion	2.9	2.61E-06	0.002
GO:0030029~actin filament-based process	4.2	1.27E-05	0.008
GO:0007155~cell adhesion	8.0	1.46E-05	0.007
GO:0022610~biological adhesion	8.0	1.47E-05	0.005
GO:0007015~actin filament organization	2.2	4.01E-05	0.012
GO:0030036~actin cytoskeleton organization	3.8	7.40E-05	0.019
GO:0051493~regulation of cytoskeleton organization	2.9	7.46E-05	0.017
GO:0051017~actin filament bundle formation	1.3	9.63E-05	0.019
GO:0005979~regulation of glycogen biosynthetic process	1.1	2.34E-04	0.042
GO:0032885~regulation of polysaccharide biosynthetic process	1.1	2.34E-04	0.042
GO:0010962~regulation of glucan biosynthetic process	1.1	2.34E-04	0.042
GO:0048771~tissue remodeling	1.8	2.91E-04	0.047
GO:0032881~regulation of polysaccharide metabolic process	1.1	3.14E-04	0.046
GO:0031529~ruffle organization	0.9	9.29E-04	0.121
GO:0043244~regulation of protein complex disassembly	1.6	0.001	0.132
GO:0043255~regulation of carbohydrate biosynthetic process	1.1	0.001	0.138
GO:0008015~blood circulation	2.9	0.001	0.138
GO:0003013~circulatory system process	2.9	0.001	0.138
GO:0035150~regulation of tube size	1.6	0.001	0.134
GO:0050880~regulation of blood vessel size	1.6	0.001	0.134
GO:0006937~regulation of muscle contraction	1.8	0.001	0.127
GO:0003018~vascular process in circulatory system	1.6	0.002	0.186
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	4.0	0.003	0.209
GO:0042311~vasodilation	1.1	0.003	0.216
GO:0007010~cytoskeleton organization	4.7	0.003	0.211
GO:0043149~stress fiber formation	0.7	0.003	0.217
GO:0007242~intracellular signaling cascade	10.0	0.003	0.232
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	2.9	0.004	0.238

GO:0010647~positive regulation of cell communication	3.8	0.004	0.256
GO:0032956~regulation of actin cytoskeleton organization	1.8	0.005	0.262
GO:0001568~blood vessel development	3.1	0.005	0.261
GO:0033043~regulation of organelle organization	2.9	0.005	0.254
GO:0043467~regulation of generation of precursor metabolites and energy	1.1	0.005	0.252
GO:0032970~regulation of actin filament-based process	1.8	0.005	0.272
GO:0007229~integrin-mediated signaling pathway	1.6	0.006	0.270
GO:0044057~regulation of system process	3.6	0.006	0.266
GO:0001944~vasculature development	3.1	0.006	0.263
GO:0030334~regulation of cell migration	2.4	0.006	0.267
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	2.9	0.006	0.262
GO:0014031~mesenchymal cell development	1.3	0.006	0.267
GO:0048762~mesenchymal cell differentiation	1.3	0.006	0.267
GO:0046324~regulation of glucose import	1.1	0.007	0.277
GO:0060485~mesenchyme development	1.3	0.007	0.274
GO:0001525~angiogenesis	2.2	0.008	0.289
GO:0010827~regulation of glucose transport	1.1	0.008	0.284
GO:0010906~regulation of glucose metabolic process	1.1	0.008	0.304
GO:0051494~negative regulation of cytoskeleton organization	1.3	0.009	0.307
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	3.3	0.009	0.308
GO:0007517~muscle organ development	2.7	0.010	0.336
GO:0010959~regulation of metal ion transport	1.6	0.011	0.356
GO:0010675~regulation of cellular carbohydrate metabolic process	1.1	0.011	0.351
GO:0046849~bone remodeling	0.9	0.012	0.365
GO:0006109~regulation of carbohydrate metabolic process	1.1	0.012	0.365
GO:0010627~regulation of protein kinase cascade	2.9	0.013	0.384
GO:0040012~regulation of locomotion	2.4	0.014	0.393
GO:0051270~regulation of cell motion	2.4	0.014	0.395
GO:0043242~negative regulation of protein complex disassembly	1.1	0.015	0.393
GO:0051050~positive regulation of transport	2.7	0.015	0.394

GO:0001894~tissue homeostasis	1.3	0.015	0.394
GO:0030048~actin filament-based movement	0.9	0.015	0.395
GO:0010740~positive regulation of protein kinase cascade	2.2	0.016	0.396
GO:0003012~muscle system process	2.2	0.016	0.401
GO:0014829~vascular smooth muscle contraction	0.7	0.017	0.414
GO:0045669~positive regulation of osteoblast differentiation	0.9	0.019	0.446
GO:0014706~striated muscle tissue development	1.8	0.021	0.461
GO:0045725~positive regulation of glycogen biosynthetic process	0.7	0.021	0.466
GO:0051930~regulation of sensory perception of pain	0.7	0.021	0.466
GO:0051931~regulation of sensory perception	0.7	0.021	0.466
GO:0051924~regulation of calcium ion transport	1.3	0.022	0.467
GO:0032483~regulation of Rab protein signal transduction	1.1	0.023	0.482
GO:0032313~regulation of Rab GTPase activity	1.1	0.023	0.482
GO:0051336~regulation of hydrolase activity	3.3	0.025	0.509
GO:0006936~muscle contraction	2.0	0.026	0.514
GO:0060537~muscle tissue development	1.8	0.026	0.511
GO:0016192~vesicle-mediated transport	4.9	0.027	0.517
GO:0043269~regulation of ion transport	1.6	0.027	0.516
GO:0006793~phosphorus metabolic process	7.3	0.028	0.517
GO:0006796~phosphate metabolic process	7.3	0.028	0.517
GO:0008217~regulation of blood pressure	1.6	0.028	0.522
GO:0006809~nitric oxide biosynthetic process	0.7	0.030	0.538
GO:0050727~regulation of inflammatory response	1.3	0.031	0.545
GO:0008016~regulation of heart contraction	1.3	0.033	0.558
GO:0030278~regulation of ossification	1.3	0.034	0.571
GO:0046209~nitric oxide metabolic process	0.7	0.035	0.574
GO:0000902~cell morphogenesis	3.3	0.038	0.596
GO:0043122~regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	1.6	0.038	0.592
GO:0051592~response to calcium ion	1.1	0.038	0.590
GO:0030155~regulation of cell adhesion	1.8	0.040	0.603
GO:0006939~smooth muscle contraction	0.9	0.040	0.600
GO:0014032~neural crest cell development	0.9	0.040	0.600
GO:0014033~neural crest cell differentiation	0.9	0.040	0.600
GO:0002028~regulation of sodium ion transport	0.7	0.040	0.598

GO:0010639~negative regulation of organelle organization	1.3	0.041	0.602
GO:0050900~leukocyte migration	1.1	0.043	0.609
GO:0033674~positive regulation of kinase activity	2.4	0.043	0.607
GO:0032989~cellular component morphogenesis	3.6	0.043	0.607
GO:0042118~endothelial cell activation	0.4	0.046	0.623
GO:0012501~programmed cell death	4.9	0.046	0.619
GO:0045453~bone resorption	0.7	0.046	0.616
GO:0051129~negative regulation of cellular component organization	1.8	0.047	0.621
GO:0048871~multicellular organismal homeostasis	1.3	0.047	0.617
GO:0031114~regulation of microtubule depolymerization	0.7	0.052	0.648
GO:0030032~lamellipodium assembly	0.7	0.052	0.648
GO:0007026~negative regulation of microtubule depolymerization	0.7	0.052	0.648
GO:0007264~small GTPase mediated signal transduction	2.9	0.052	0.645
GO:0042981~regulation of apoptosis	6.0	0.052	0.644
GO:0008064~regulation of actin polymerization or depolymerization	1.1	0.052	0.642
GO:0051347~positive regulation of transferase activity	2.4	0.053	0.640
GO:0046907~intracellular transport	5.1	0.053	0.638
GO:0044093~positive regulation of molecular function	4.7	0.054	0.639
GO:0001934~positive regulation of protein amino acid phosphorylation	1.3	0.055	0.647
GO:0046578~regulation of Ras protein signal transduction	2.2	0.056	0.645
GO:0007266~Rho protein signal transduction	0.9	0.057	0.652
GO:0031111~negative regulation of microtubule polymerization or depolymerization	0.7	0.058	0.652
GO:0042310~vasoconstriction	0.7	0.058	0.652
GO:0030832~regulation of actin filament length	1.1	0.058	0.649
GO:0043067~regulation of programmed cell death	6.0	0.058	0.648
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	5.1	0.059	0.647
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	4.0	0.059	0.645
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	4.0	0.059	0.645

GO:0010941~regulation of cell death	6.0	0.060	0.649
GO:0070201~regulation of establishment of protein localization	1.6	0.062	0.658
GO:0042692~muscle cell differentiation	1.6	0.062	0.658
GO:0007507~heart development	2.2	0.063	0.660
GO:0000165~MAPKKK cascade	2.0	0.063	0.658
GO:0010863~positive regulation of phospholipase C activity	1.1	0.063	0.657
GO:0007202~activation of phospholipase C activity	1.1	0.063	0.657
GO:0007519~skeletal muscle tissue development	1.1	0.066	0.671
GO:0060538~skeletal muscle organ development	1.1	0.066	0.671
GO:0006915~apoptosis	4.7	0.067	0.669
GO:0009137~purine nucleoside diphosphate catabolic process	0.4	0.068	0.672
GO:0030202~heparin metabolic process	0.4	0.068	0.672
GO:0009181~purine ribonucleoside diphosphate catabolic process	0.4	0.068	0.672
GO:0034329~cell junction assembly	0.9	0.069	0.674
GO:0051056~regulation of small GTPase mediated signal transduction	2.4	0.069	0.673
GO:0008154~actin polymerization or depolymerization	0.7	0.070	0.677
GO:0051492~regulation of stress fiber formation	0.7	0.070	0.677
GO:0010907~positive regulation of glucose metabolic process	0.7	0.070	0.677
GO:0060627~regulation of vesicle-mediated transport	1.3	0.072	0.681
GO:0043270~positive regulation of ion transport	0.9	0.073	0.683
GO:0070507~regulation of microtubule cytoskeleton organization	0.9	0.073	0.683
GO:0042327~positive regulation of phosphorylation	1.3	0.074	0.688
GO:0043123~positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	1.3	0.074	0.688
GO:0045860~positive regulation of protein kinase activity	2.2	0.075	0.688
GO:0042325~regulation of phosphorylation	3.8	0.075	0.688
GO:0010518~positive regulation of phospholipase activity	1.1	0.076	0.686
GO:0045667~regulation of osteoblast differentiation	0.9	0.077	0.689

GO:0045913~positive regulation of carbohydrate metabolic process	0.7	0.077	0.687
GO:0010676~positive regulation of cellular carbohydrate metabolic process	0.7	0.077	0.687
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	5.3	0.079	0.693
GO:0030509~BMP signaling pathway	0.9	0.081	0.701
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	2.4	0.081	0.699
GO:0010517~regulation of phospholipase activity	1.1	0.082	0.699
GO:0050678~regulation of epithelial cell proliferation	1.1	0.082	0.699
GO:0045937~positive regulation of phosphate metabolic process	1.3	0.082	0.698
GO:0010562~positive regulation of phosphorus metabolic process	1.3	0.082	0.698
GO:0006928~cell motion	3.8	0.084	0.701
GO:0032231~regulation of actin filament bundle formation	0.7	0.084	0.700
GO:0006414~translational elongation	1.3	0.085	0.702
GO:0051495~positive regulation of cytoskeleton organization	0.9	0.086	0.701
GO:0030030~cell projection organization	3.1	0.086	0.702
GO:0010810~regulation of cell-substrate adhesion	0.9	0.090	0.715
GO:0046824~positive regulation of nucleocytoplasmic transport	0.7	0.091	0.717
GO:0007243~protein kinase cascade	3.1	0.091	0.716
GO:0051051~negative regulation of transport	1.6	0.093	0.721
GO:0060193~positive regulation of lipase activity	1.1	0.096	0.728
GO:0030097~hemopoiesis	2.2	0.098	0.734
GO:0009154~purine ribonucleotide catabolic process	0.7	0.098	0.733
GO:0001755~neural crest cell migration	0.7	0.098	0.733
GO:0032535~regulation of cellular component size	2.4	0.099	0.733
GO:0043410~positive regulation of MAPKKK cascade	0.9	0.099	0.731
GO:0060249~anatomical structure homeostasis	1.3	0.099	0.730

8.5 ANEXO 5. FENÓMENOS BIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES DE LOS GENES INCLUIDOS EN EL MODELO SEGÚN SE RECOGEN EN EL RECURSO PÚBLICO BIOINFORMÁTICO *CONSENSUS PATHWAY DATABASE, RELEASE 31* ([HTTP://CONSENSUSPATHDB.ORG](http://consensuspathdb.org)).

Procesos biológicos de los genes correlacionados positivamente con el SUV.

pathway	q-value	source
Scavenging by Class A Receptors	0.0022	Reactome
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0.0036	Reactome
Protein processing in endoplasmic reticulum - Homo sapiens (human)	0.0036	KEGG
Asparagine N-linked glycosylation	0.0045	Reactome
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	0.0233	Reactome
Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	0.0272	Reactome
PD-1 signaling	0.0364	Reactome
Antigen processing and presentation - Homo sapiens (human)	0.0396	KEGG
CD4 T cell receptor signaling-JNK cascade	0.0412	INOH
Metabolism of carbohydrates	0.0468	Reactome
DNA Replication	0.0550	Reactome
Generation of second messenger molecules	0.0621	Reactome
ATF6-alpha activates chaperone genes	0.0629	Wikipathways
CD4 T cell receptor signaling-ERK cascade	0.0713	INOH
N-Glycan biosynthesis	0.0715	EHMN
DNA Replication	0.0715	Wikipathways
Scavenging by Class F Receptors	0.0715	Reactome
Porphyrin metabolism	0.0937	INOH
Pentose phosphate cycle	0.0954	INOH
glycolysis	0.0954	HumanCyc
Downstream TCR signaling	0.0954	Reactome
N-Glycan biosynthesis - Homo sapiens (human)	0.0954	KEGG
Allograft Rejection	0.0988	Wikipathways
Phagosome - Homo sapiens (human)	0.0988	KEGG
Vesicle-mediated transport	0.0988	Reactome
heme biosynthesis	0.0988	HumanCyc
Heme Biosynthesis	0.0988	Wikipathways
Mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis	0.0988	Reactome
Removal of licensing factors from origins	0.0988	Reactome

Regulation of DNA replication	0.0988	Reactome
Pentose phosphate pathway - Homo sapiens (human)	0.1000	KEGG
Insulin-mediated glucose transport	0.1000	PID
Sulfur relay system - Homo sapiens (human)	0.1000	KEGG
Acetaminophen Metabolism Pathway	0.1000	SMPDB
Galactose metabolism - Homo sapiens (human)	0.1000	KEGG
Asthma - Homo sapiens (human)	0.1000	KEGG
MHC class II antigen presentation	0.1030	Reactome
Glycolysis	0.1030	Reactome

Procesos biológicos de los genes correlacionados negativamente con el SUV.

pathway	q-value	source
Smooth Muscle Contraction	3.29E-10	Reactome
Muscle contraction	6.72E-07	Reactome
Stabilization and expansion of the E-cadherin adherens junction	5.21E-06	PID
RHO GTPases activate CIT	0.0002	Reactome
RHO GTPases Activate ROCKs	0.0002	Reactome
Adherens junction - Homo sapiens (human)	0.0006	KEGG
Regulation of actin cytoskeleton - Homo sapiens (human)	0.0006	KEGG
RHO GTPases activate PAKs	0.0008	Reactome
Signaling by Rho GTPases	0.0008	Reactome
Axon guidance	0.0008	Reactome
Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse	0.0008	Reactome
E-cadherin signaling in the nascent adherens junction	0.0008	PID
Arf6 downstream pathway	0.0008	PID
Developmental Biology	0.0008	Reactome
Sema4D in semaphorin signaling	0.0013	Reactome
TGF beta Signaling Pathway	0.0018	Wikipathways
Signaling by VEGF	0.0018	Reactome
RHO GTPase Effectors	0.0033	Reactome
Vascular smooth muscle contraction - Homo sapiens (human)	0.0033	KEGG
VEGFA-VEGFR2 Pathway	0.0035	Reactome
Integrin	0.0037	INOH
N-cadherin signaling events	0.0046	PID
Signaling events mediated by PRL	0.0046	PID
MAPK family signaling cascades	0.0047	Reactome
RHO GTPases activate IQGAPs	0.0049	Reactome
Focal adhesion - Homo sapiens (human)	0.0066	KEGG
EPH-Ephrin signaling	0.0091	Reactome
Regulation of Actin Cytoskeleton	0.0158	Wikipathways
Semaphorin interactions	0.0197	Reactome
Androgen receptor signaling pathway	0.0219	Wikipathways
EPHA-mediated growth cone collapse	0.0230	Reactome

Regulation of cytoplasmic and nuclear SMAD2/3 signaling	0.0230	PID
Signaling by Interleukins	0.0241	Reactome
RHO GTPases activate PKNs	0.0241	Reactome
E-cadherin signaling in keratinocytes	0.0248	PID
MAPK1/MAPK3 signaling	0.0248	Reactome
RHO GTPases Activate WASPs and WAVES	0.0253	Reactome
RAF-independent MAPK1/3 activation	0.0327	Reactome
Laminin interactions	0.0327	Reactome
Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	0.0327	Reactome
TGF_beta_Receptor	0.0327	NetPath
Rho GTPase cycle	0.0327	Reactome
Physiological and Pathological Hypertrophy of the Heart	0.0350	Wikipathways
BMP receptor signaling	0.0387	PID
Signalling by NGF	0.0398	Reactome
EGFR1	0.0398	NetPath
RAF/MAP kinase cascade	0.0398	Reactome
SHC1 events in EGFR signaling	0.0398	Reactome
SOS-mediated signalling	0.0398	Reactome
GRB2 events in EGFR signaling	0.0398	Reactome
SHC1 events in ERBB2 signaling	0.0398	Reactome
SHC1 events in ERBB4 signaling	0.0398	Reactome
GRB2 events in ERBB2 signaling	0.0398	Reactome
Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling	0.0398	PID
FRS-mediated FGFR2 signaling	0.0398	Reactome
FRS-mediated FGFR1 signaling	0.0398	Reactome
FRS-mediated FGFR3 signaling	0.0398	Reactome
FRS-mediated FGFR4 signaling	0.0398	Reactome
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	0.0416	Reactome
Nonsense-Mediated Decay (NMD)	0.0416	Reactome
Signalling to p38 via RIT and RIN	0.0416	Reactome
ARMS-mediated activation	0.0416	Reactome
Shigellosis - Homo sapiens (human)	0.0416	KEGG
VEGFR2 mediated vascular permeability	0.0418	Reactome
Frs2-mediated activation	0.0418	Reactome
Integrin-linked kinase signaling	0.0428	PID

Tight junction - Homo sapiens (human)	0.0428	KEGG
Prolonged ERK activation events	0.0434	Reactome
Signaling by Leptin	0.0437	Reactome
Arf6 trafficking events	0.0437	PID
agrin in postsynaptic differentiation	0.0437	BioCarta
Signalling to RAS	0.0437	Reactome
Dilated cardiomyopathy - Homo sapiens (human)	0.0437	KEGG
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	0.0437	PID
DAP12 signaling	0.0437	Reactome
Interleukin receptor SHC signaling	0.0437	Reactome
D- <i>myo</i> -inositol (1,3,4)-trisphosphate biosynthesis	0.0441	HumanCyc
1D- <i>myo</i> -inositol hexakisphosphate biosynthesis II (mammalian)	0.0441	HumanCyc
mcalpain and friends in cell motility	0.0443	BioCarta
Spinal Cord Injury	0.0445	Wikipathways
VEGFR2 mediated cell proliferation	0.0457	Reactome
Lisencephaly gene (LIS1) in neuronal migration and development	0.0457	PID
activation of camp-dependent protein kinase pka	0.0457	BioCarta
erk and pi-3 kinase are necessary for collagen binding in corneal epithelia	0.0457	BioCarta
Leukocyte transendothelial migration - Homo sapiens (human)	0.0457	KEGG
LRR FLII-interacting protein 1 (LRRFIP1) activates type I IFN production	0.0457	Reactome
Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK	0.0457	Reactome
Eukaryotic Translation Termination	0.0457	Reactome
CDC42 signaling events	0.0457	PID
Signalling to ERKs	0.0464	Reactome
Interleukin-2 signaling	0.0476	Reactome
rho cell motility signaling pathway	0.0476	BioCarta
role of -arrestins in the activation and targeting of map kinases	0.0476	BioCarta
Wnt Signaling Pathway Netpath	0.0476	Wikipathways
Signaling by ERBB4	0.0480	Reactome
Proteoglycans in cancer - Homo sapiens (human)	0.0480	KEGG
Signaling by SCF-KIT	0.0480	Reactome
integrin signaling pathway	0.0480	BioCarta

role of egf receptor transactivation by gpcrs in cardiac hypertrophy	0.0480	BioCarta
Alpha 6 Beta 4 signaling pathway	0.0480	Wikipathways
ucalpain and friends in cell spread	0.0480	BioCarta
Beta-catenin phosphorylation cascade	0.0480	Reactome
Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy	0.0480	Wikipathways
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) - Homo sapiens (human)	0.0480	KEGG
Downstream signaling of activated FGFR2	0.0490	Reactome
Downstream signaling of activated FGFR1	0.0490	Reactome
Downstream signaling of activated FGFR3	0.0490	Reactome
Downstream signaling of activated FGFR4	0.0490	Reactome
DAP12 interactions	0.0490	Reactome
L1CAM interactions	0.0490	Reactome
Calcium signaling pathway - Homo sapiens (human)	0.0491	KEGG
Signaling by FGFR3	0.0491	Reactome
Signaling by FGFR4	0.0491	Reactome
BMP Signalling Pathway	0.0491	HumanCyc
Degradation of beta catenin	0.0491	PID
er associated degradation (erad) pathway	0.0491	BioCarta
CREB phosphorylation through the activation of CaMKK	0.0491	Reactome
Regulation of ornithine decarboxylase (ODC)	0.0491	Reactome
Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	0.0491	Reactome
Signaling by FGFR1	0.0491	Reactome
Degradation of beta-catenin by the destruction complex	0.0491	Reactome
Signaling by FGFR2	0.0491	Reactome
Bacterial invasion of epithelial cells - Homo sapiens (human)	0.0491	KEGG
Signaling by FGFR	0.0491	Reactome
roles of arrestin dependent recruitment of src kinases in gpcr signaling	0.0491	BioCarta
S1P1 pathway	0.0491	PID
role of mal in rho-mediated activation of srf	0.0491	BioCarta
Signaling by ERBB2	0.0491	Reactome
FCERI mediated MAPK activation	0.0491	Reactome
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	0.0491	Reactome
Downstream signal transduction	0.0491	Reactome

Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)	0.0491	PID
Cytokine Signaling in Immune system	0.0491	Reactome
Hypertrophy Model	0.0491	Wikipathways
superpathway of D- <i>myo</i> -inositol (1,4,5)-trisphosphate metabolism	0.0491	HumanCyc
Phenytoin (Antiarrhythmic) Action Pathway	0.0491	SMPDB
NrCAM interactions	0.0491	Reactome
Ubiquinol biosynthesis	0.0491	Reactome
ubiquinol-10 biosynthesis	0.0491	HumanCyc
G13 Signaling Pathway	0.0491	Wikipathways
Striated Muscle Contraction	0.0491	Wikipathways
Regulation of RAC1 activity	0.0491	PID
Focal Adhesion	0.0491	Wikipathways
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) - Homo sapiens (human)	0.0491	KEGG

8.6 ANEXO 6. FENÓMENOS BIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES DE LOS GENES INCLUIDOS EN EL MODELO SEGÚN SE RECOGEN EN EL RECURSO PÚBLICO BIOINFORMÁTICO *STRING 10.0* ([HTTP://STRING-DB.ORG/](http://string-db.org/)).

Procesos biológicos de los genes correlacionados positivamente con el SUV.

pathway ID	pathway description	false discovery rate
GO.0034660	ncRNA metabolic process	4.94E-05
GO.0006396	RNA processing	5.04E-05
GO.0008152	metabolic process	0.0002
GO.0044238	primary metabolic process	0.0002
GO.0071704	organic substance metabolic process	0.0002
GO.0044237	cellular metabolic process	0.0003
GO.0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	0.0005
GO.0042254	ribosome biogenesis	0.0011
GO.0034470	ncRNA processing	0.0014
GO.0006807	nitrogen compound metabolic process	0.0017
GO.0043170	macromolecule metabolic process	0.0061
GO.0044260	cellular macromolecule metabolic process	0.0061
GO.0018279	protein N-linked glycosylation via asparagine	0.0257
GO.0044723	single-organism carbohydrate metabolic process	0.0257
GO.1901360	organic cyclic compound metabolic process	0.0257
GO.1901564	organonitrogen compound metabolic process	0.0344
GO.0006364	rRNA processing	0.0367
GO.0005975	carbohydrate metabolic process	0.0400
GO.0006486	protein glycosylation	0.0404
GO.0006399	tRNA metabolic process	0.0409
GO.0046483	heterocycle metabolic process	0.0497

Procesos biológicos de los genes correlacionados negativamente con el SUV.

pathway ID	pathway description	false discovery rate
GO.0003012	muscle system process	1.10E-06
GO.0006936	muscle contraction	1.10E-06
GO.0051128	regulation of cellular component organization	1.10E-06
GO.0051493	regulation of cytoskeleton organization	1.10E-06
GO.0007160	cell-matrix adhesion	4.88E-06
GO.0031589	cell-substrate adhesion	3.62E-05
GO.0030029	actin filament-based process	4.03E-05
GO.0030036	actin cytoskeleton organization	8.50E-05
GO.0048518	positive regulation of biological process	8.50E-05
GO.0072358	cardiovascular system development	0.0001
GO.0072359	circulatory system development	0.0001
GO.0001525	angiogenesis	0.0002
GO.0001944	vasculature development	0.0003
GO.0016043	cellular component organization	0.0003
GO.0065007	biological regulation	0.0003
GO.0001568	blood vessel development	0.0004
GO.0050789	regulation of biological process	0.0008
GO.0032970	regulation of actin filament-based process	0.0008
GO.0048514	blood vessel morphogenesis	0.0017
GO.0048010	vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	0.0020
GO.0061564	axon development	0.0020
GO.0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	0.0024
GO.0008015	blood circulation	0.0024
GO.0016192	vesicle-mediated transport	0.0024
GO.0032956	regulation of actin cytoskeleton organization	0.0024
GO.0044087	regulation of cellular component biogenesis	0.0024
GO.0007155	cell adhesion	0.0024
GO.0048522	positive regulation of cellular process	0.0024
GO.0050794	regulation of cellular process	0.0024
GO.0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	0.0025
GO.0051129	negative regulation of cellular component organization	0.0026
GO.0031175	neuron projection development	0.0028

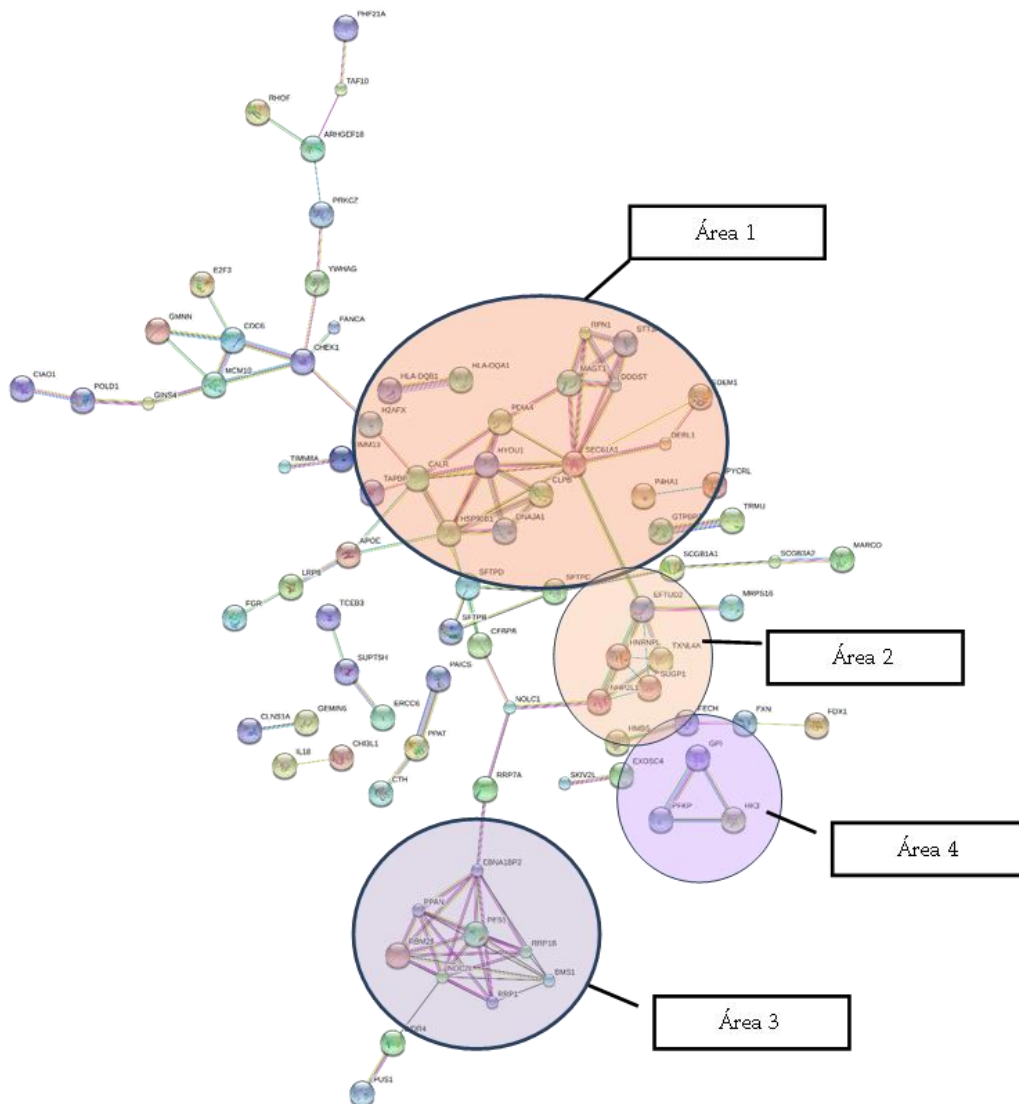
GO.0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	0.0029
GO.0051347	positive regulation of transferase activity	0.0032
GO.1902531	regulation of intracellular signal transduction	0.0045
GO.0043244	regulation of protein complex disassembly	0.0045
GO.0008217	regulation of blood pressure	0.0050
GO.0051179	localization	0.0050
GO.0048523	negative regulation of cellular process	0.0052
GO.0003013	circulatory system process	0.0058
GO.0032879	regulation of localization	0.0063
GO.0048519	negative regulation of biological process	0.0066
GO.0007264	small GTPase mediated signal transduction	0.0068
GO.0065009	regulation of molecular function	0.0069
GO.1901879	regulation of protein depolymerization	0.0069
GO.0009653	anatomical structure morphogenesis	0.0080
GO.0007015	actin filament organization	0.0082
GO.0044267	cellular protein metabolic process	0.0086
GO.0006996	organelle organization	0.0109
GO.0007409	axonogenesis	0.0109
GO.0050790	regulation of catalytic activity	0.0110
GO.0001934	positive regulation of protein phosphorylation	0.0111
GO.0033674	positive regulation of kinase activity	0.0116
GO.0035556	intracellular signal transduction	0.0116
GO.0045860	positive regulation of protein kinase activity	0.0130
GO.1902589	single-organism organelle organization	0.0130
GO.0090066	regulation of anatomical structure size	0.0136
GO.0050880	regulation of blood vessel size	0.0157
GO.0022604	regulation of cell morphogenesis	0.0166
GO.0048468	cell development	0.0166
GO.0051495	positive regulation of cytoskeleton organization	0.0166
GO.0048812	neuron projection morphogenesis	0.0171
GO.0009611	response to wounding	0.0179
GO.0033043	regulation of organelle organization	0.0179
GO.0042060	wound healing	0.0179
GO.0051234	establishment of localization	0.0179
GO.0009966	regulation of signal transduction	0.0181
GO.0030030	cell projection organization	0.0181
GO.0030168	platelet activation	0.0181

GO.0032989	cellular component morphogenesis	0.0181
GO.0043085	positive regulation of catalytic activity	0.0182
GO.0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	0.0200
GO.0003018	vascular process in circulatory system	0.0203
GO.0006810	transport	0.0209
GO.0048583	regulation of response to stimulus	0.0219
GO.0044093	positive regulation of molecular function	0.0222
GO.0044248	cellular catabolic process	0.0222
GO.0003014	renal system process	0.0225
GO.0007010	cytoskeleton organization	0.0232
GO.0032147	activation of protein kinase activity	0.0239
GO.0090257	regulation of muscle system process	0.0239
GO.2000278	regulation of DNA biosynthetic process	0.0239
GO.0010810	regulation of cell-substrate adhesion	0.0243
GO.0006897	endocytosis	0.0244
GO.0030334	regulation of cell migration	0.0246
GO.0050878	regulation of body fluid levels	0.0263
GO.2000145	regulation of cell motility	0.0263
GO.0051336	regulation of hydrolase activity	0.0276
GO.0001932	regulation of protein phosphorylation	0.0278
GO.0051345	positive regulation of hydrolase activity	0.0278
GO.0010811	positive regulation of cell-substrate adhesion	0.0292
GO.0042327	positive regulation of phosphorylation	0.0306
GO.0009057	macromolecule catabolic process	0.0311
GO.0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0.0311
GO.0008150	biological_process	0.0314
GO.0010594	regulation of endothelial cell migration	0.0323
GO.0006915	apoptotic process	0.0331
GO.0006939	smooth muscle contraction	0.0342
GO.0010632	regulation of epithelial cell migration	0.0342
GO.0023051	regulation of signaling	0.0342
GO.0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	0.0342
GO.0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	0.0349
GO.0010646	regulation of cell communication	0.0362
GO.0008219	cell death	0.0367
GO.0044265	cellular macromolecule catabolic process	0.0371
GO.0070257	positive regulation of mucus secretion	0.0371

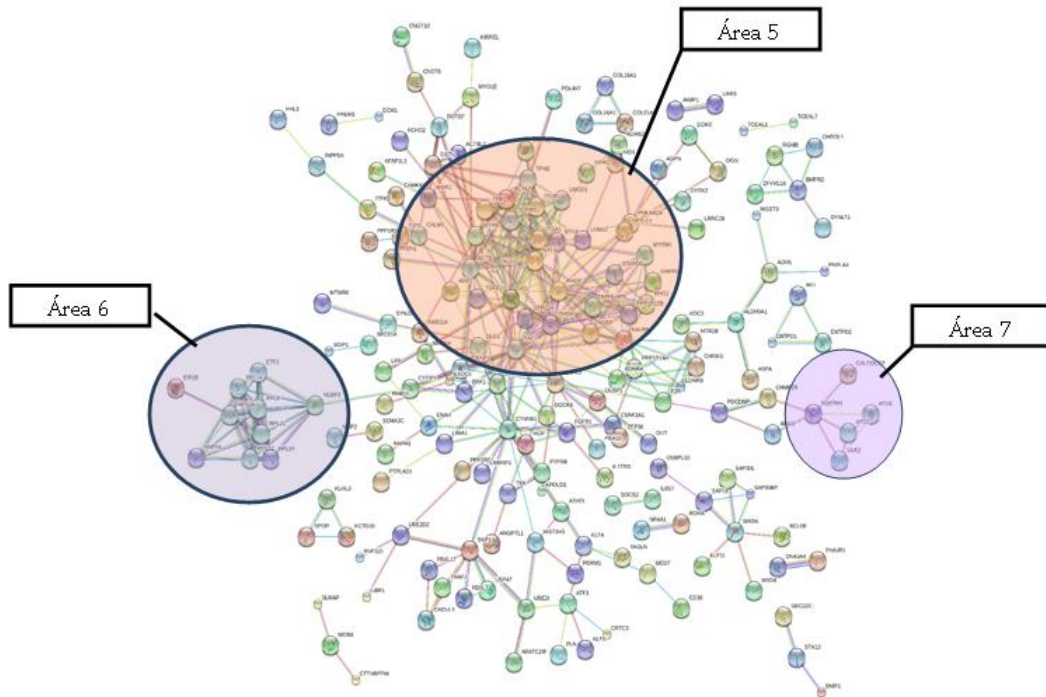
GO.2000601	positive regulation of Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	0.0371
GO.0042311	vasodilation	0.0378
GO.0061061	muscle structure development	0.0381
GO.0007166	cell surface receptor signaling pathway	0.0389
GO.0009968	negative regulation of signal transduction	0.0389
GO.0043297	apical junction assembly	0.0389
GO.1902533	positive regulation of intracellular signal transduction	0.0389
GO.0006937	regulation of muscle contraction	0.0406
GO.0007411	axon guidance	0.0406
GO.0009888	tissue development	0.0406
GO.0048667	cell morphogenesis involved in neuron differentiation	0.0406
GO.0048675	axon extension	0.0406
GO.0009967	positive regulation of signal transduction	0.0407
GO.0030048	actin filament-based movement	0.0407
GO.0030834	regulation of actin filament depolymerization	0.0407
GO.0044699	single-organism process	0.0413
GO.0042325	regulation of phosphorylation	0.0436
GO.0061024	membrane organization	0.0443
GO.0046209	nitric oxide metabolic process	0.0447
GO.0051270	regulation of cellular component movement	0.0448
GO.0086100	endothelin receptor signaling pathway	0.0449
GO.1902766	skeletal muscle satellite cell migration	0.0449
GO.0051130	positive regulation of cellular component organization	0.0453
GO.0009987	cellular process	0.0466
GO.0051239	regulation of multicellular organismal process	0.0466
GO.0072006	nephron development	0.0472
GO.0051056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	0.0475
GO.0006928	movement of cell or subcellular component	0.0488
GO.0048666	neuron development	0.0488
GO.0032990	cell part morphogenesis	0.0494
GO.0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	0.0494
GO.0010647	positive regulation of cell communication	0.0498

8.7 ANEXO 7. MAPAS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA A PARTIR DE LOS GENES INCLUIDOS EN EL MODELO SEGÚN SE RECOGEN EN EL RECURSO PÚBLICO BIOINFORMÁTICO *STRING 10.0* ([HTTP://STRING-DB.ORG/](http://string-db.org/)).

Mapa basado en los genes correlacionados positivamente con el SUV.



Mapa basado en los genes correlacionados negativamente con el SUV.



8.8 ANEXO 8. CANONICAL PATHWAYS MÁS SIGNIFICATIVAS OBTENIDOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL SSGSEA Y SU COEFICIENTE DE CORRELACIÓN RESPECTO DEL SUV ($P < 0.05$).

Canonical Pathways	CR vs SUV	p-value
BIOCARTA_PTEN_PATHWAY	-0.3956	0.0006
SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_A_UP	-0.3845	0.0009
KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTI ON	-0.3827	0.001
PID_AR_TF_PATHWAY	-0.3816	0.001
KEGG_CALCIUM_SIGNALING_PATHWAY	-0.3673	0.0016
CHANDRAN_METASTASIS_DN	-0.3588	0.0021
BIOCARTA_ECM_PATHWAY	-0.3508	0.0027
PID_LYSOPHOSPHOLIPID_PATHWAY	-0.3461	0.0031
VANTVEER_BREAST_CANCER_BRCA1_DN	-0.3404	0.0037
PID_S1P_S1P3_PATHWAY	-0.3395	0.0038
ST_INTEGRIN_SIGNALING_PATHWAY	-0.3382	0.0039
REACTOME_AMINE_LIGAND_BINDING_RECEPTORS	-0.338	0.0039
PID_ARF6_TRAFFICKING_PATHWAY	-0.3304	0.0049
ASTON_MAJOR_DEPRESSIVE_DISORDER_DN	-0.3301	0.0049
PID_ERBB4_PATHWAY	-0.3275	0.0053
LOPEZ_TRANSLATION_VIA_FN1_SIGNALING	-0.3255	0.0056
REACTOME_PI3K_EVENTS_IN_ERBB4_SIGNALING	-0.3232	0.006
FERRARI_RESPONSE_TO_FENRETINIDE_DN	-0.3218	0.0062
DOANE_RESPONSE_TO_ANDROGEN_DN	-0.3206	0.0064
OUELLET_CULTURED_OVARIAN_CANCER_INVASIVE _VS_LMP_DN	-0.3187	0.0068
ZHENG_GLIOMASTOMA_PLASTICITY_DN	-0.3186	0.0068
KYNG_WERNER_SYNDROM_UP	-0.3178	0.0069
BERTUCCI_MEDULLARY_VS_DUCTAL_BREAST_CAN CER_DN	-0.3161	0.0072
BIOCARTA_AKAP13_PATHWAY	-0.3156	0.0073
BROWN_MYELOID_CELL_DEVELOPMENT_DN	0.3152	0.0074
RUAN_RESPONSE_TO_TNF_UP	0.3144	0.0076
KEGG_GNRH_SIGNALING_PATHWAY	-0.314	0.0077
BHAT_ESR1_TARGETS_NOT_VIA_AKT1_DN	-0.3135	0.0078
DER_IFN_GAMMA_RESPONSE_DN	-0.3116	0.0082
PID_TRKR_PATHWAY	-0.3106	0.0084
PID_ENDOTHELIN_PATHWAY	-0.3101	0.0085

REACTOME_NUCLEAR_RECEPTOR_TRANSCRIPTION_PATHWAY	-0.3101	0.0085
MULLIGAN_NTF3_SIGNALING_VIA_INSR_AND_IGF1R_DN	-0.3068	0.0093
REACTOME_TRYPTOPHAN_CATABOLISM	0.3042	0.0099
CHEBOTAEV_GR_TARGETS_UP	-0.3008	0.0108
ACEVEDO_FGFR1_TARGETS_IN_PROSTATE_CANCER_MODEL_DN	-0.2989	0.0113
ONKEN_UVEAL_MELANOMA_DN	-0.2975	0.0117
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_GREY_UP	-0.2975	0.0117
REACTOME_SIGNALING_BY_ERBB4	-0.2971	0.0119
MYLLYKANGAS_AMPLIFICATION_HOT_SPOT_5	0.2964	0.0121
REACTOME_SIGNALING_BY_ERBB2	-0.2957	0.0123
PARENT_MTOR_SIGNALING_DN	-0.2931	0.0131
PID_RET_PATHWAY	-0.2931	0.0131
KEGG_GALACTOSE_METABOLISM	0.2924	0.0134
BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY	-0.2919	0.0135
RIZKI_TUMOR_INVASIVENESS_3D_DN	0.2906	0.014
REACTOME_CGMP_EFFECTS	-0.2905	0.014
IZADPANAH_STEM_CELL_ADIPOSE_VS_BONE_DN	-0.2902	0.0141
KEGG_MTOR_SIGNALING_PATHWAY	-0.2888	0.0146
LOPEZ_MESOTHELIOMA_SURVIVAL_WORST_VS_BEST_UP	-0.2884	0.0147
GESERICK_TERT_TARGETS_DN	-0.2871	0.0152
REACTOME_PI3K_EVENTS_IN_ERBB2_SIGNALING	-0.2866	0.0154
SUNG_METASTASIS_STROMA_DN	0.286	0.0156
RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_12HR	-0.2856	0.0158
KEGG_AXON_GUIDANCE	-0.2853	0.0159
KEGG_ENDOCYTOSIS	-0.285	0.016
REACTOME_SIGNALING_BY_PDGF	-0.2849	0.016
PAPASPYRIDONOS_UNSTABLE_ATEROSCLEROTIC_PLAQUE_DN	-0.2839	0.0164
DANG_REGULATED_BY_MYC_UP	0.2839	0.0164
CHEN_LVAD_SUPPORT_OF_FAILING_HEART_UP	-0.2834	0.0166
REACTOME_AXON_GUIDANCE	-0.2829	0.0168
DAIRKEE_TERT_TARGETS_DN	-0.2819	0.0172
WANG_PROSTATE_CANCER_ANDROGEN_INDEPENDENT	-0.2815	0.0174
CUI_TCF21_TARGETS_2_DN	-0.2814	0.0174

KEGG_DILATED_CARDIOMYOPATHY	-0.2813	0.0175
CHOI_ATL_STAGE_PREDICTOR	0.2809	0.0177
KRIGE_RESPONSE_TO_TOSEDOSTAT_6HR_DN	0.2803	0.0179
REACTOME_SIGNALING_BY_FGFR	-0.2792	0.0184
REACTOME_NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH	-0.279	0.0185
DAZARD_UV_RESPONSE_CLUSTER_G5	0.2787	0.0186
PID_NCADHERIN_PATHWAY	-0.2782	0.0188
FIGUEROA_AML_METHYLATION_CLUSTER_6_UP	-0.2777	0.019
CUI_GLUCOSE_DEPRIVATION	0.2766	0.0196
LANDIS_ERBB2_BREAST_TUMORS_65_DN	-0.2764	0.0196
CASTELLANO_NRAS_TARGETS_DN	-0.2764	0.0197
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CLUSTER_15	-0.2762	0.0197
BIOCARTA_INTEGRIN_PATHWAY	-0.2759	0.0199
PID_ER_NONGENOMIC_PATHWAY	-0.2759	0.0199
LEE_NEURAL_CREST_STEM_CELL_DN	-0.2751	0.0202
MATZUK_SPERMATOGONIA	-0.2748	0.0204
WATANABE_ULCERATIVE_COLITIS_WITH_CANCER_UP	-0.2744	0.0206
TAKADA_GASTRIC_CANCER_COPY_NUMBER_DN	-0.2742	0.0207
REACTOME_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	-0.274	0.0207
COLLER_MYC_TARGETS_DN	-0.274	0.0208
GENTILE_UV_LOW_DOSE_DN	-0.2738	0.0208
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_16Q24_AMPLICON	0.2737	0.0209
STARK_HYPPOCAMPUS_22Q11_DELETION_UP	-0.2722	0.0217
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_12Q24_AMPLICON	0.2712	0.0222
BIOCARTA_RAS_PATHWAY	-0.2692	0.0232
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_CD2_DN	0.269	0.0233
BIOCARTA_MYOSIN_PATHWAY	-0.2689	0.0233
DAWSON_METHYLATED_IN_LYMPHOMA_TCL1	-0.2689	0.0234
REACTOME_DOWNSTREAM_SIGNAL_TRANSDUCTION	-0.2687	0.0235
PEREZ_TP63_TARGETS	-0.2686	0.0235
BIOCARTA_CELL2CELL_PATHWAY	-0.2682	0.0237
BIOCARTA_IGF1_PATHWAY	-0.2676	0.024
PID_SMAD2_3NUCLEAR_PATHWAY	-0.2675	0.0241
BIOCARTA_AGR_PATHWAY	-0.2675	0.0241
SOTIRIOU_BREAST_CANCER_GRADE_1_VS_3_DN	-0.2674	0.0242

REACTOME_DOWNSTREAM_SIGNALING_OF_ACTIVATED_FGFR	-0.2673	0.0242
LEE_AGING_MUSCLE_UP	-0.2669	0.0245
BEGUM_TARGETS_OF_PAX3_FOXO1_FUSION_UP	-0.2668	0.0245
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_MODERATELY_VS_POORLY_UP	-0.2665	0.0247
FIGUEROA_AML_METHYLATION_CLUSTER_7_UP	-0.2654	0.0253
KEGG_GAP_JUNCTION	-0.2648	0.0256
BIOCARTA_CCR3_PATHWAY	-0.2643	0.026
ST_TYPE_I_INTERFERON_PATHWAY	0.264	0.0261
BIOCARTA_PAR1_PATHWAY	-0.2632	0.0266
PID_MAPK_TRK_PATHWAY	-0.2626	0.0269
BENPORATH_SUZ12_TARGETS	-0.2624	0.027
NIELSEN_GIST	-0.2624	0.0271
MARTIN_INTERACT_WITH_HDAC	-0.2622	0.0272
TESAR_ALK_TARGETS_EPISC_4D_UP	-0.262	0.0273
KEGG_HYPERTROPHIC_CARDIOMYOPATHY_HCM	-0.262	0.0273
XU_GH1_AUTOCRINE_TARGETS_UP	-0.2617	0.0275
SHIN_B_CELL_LYMPHOMA_CLUSTER_8	0.2616	0.0275
TOMLINS_PROSTATE_CANCER_DN	-0.2613	0.0277
REACTOME_G_ALPHA1213_SIGNALLING_EVENTS	-0.2612	0.0278
KRIGE_RESPONSE_TO_TOSEDOSTAT_24HR_DN	0.2611	0.0279
KIM_TIAL1_TARGETS	0.261	0.0279
KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	-0.2609	0.028
EHLERS_ANEUPLOIDY_UP	-0.2609	0.028
SPIELMAN_LYMPHOBLAST_EUROPEAN_VS_ASIAN_UP	0.2606	0.0282
REACTOME_NUCLEAR_SIGNALING_BY_ERBB4	-0.2599	0.0286
PID_FAK_PATHWAY	-0.2597	0.0287
PID_S1P_S1P2_PATHWAY	-0.2597	0.0287
REACTOME_ADENYLATE_CYCLASE_INHIBITORY_PATHWAY	-0.2597	0.0288
LIU_PROSTATE_CANCER_DN	-0.2594	0.0289
REACTOME_ASSOCIATION_OF_LICENSEING_FACTOR_S_WITH_THE_PRE_REPLICATIVE_COMPLEX	0.259	0.0292
BIOCARTA_NFAT_PATHWAY	-0.2588	0.0293
REACTOME_THROMBIN_SIGNALLING_THROUGH_PROTEINASE_ACTIVATED_RECEPTORS_PARS	-0.2583	0.0296
REACTOME_SIGNALLING_BY_NGF	-0.2583	0.0296
SEIKE_LUNG_CANCER_POOR_SURVIVAL	0.2581	0.0298

PID_THROMBIN_PAR1_PATHWAY	-0.258	0.0298
GINESTIER_BREAST_CANCER_20Q13_AMPLIFICATI ON_UP	-0.2573	0.0303
RODRIGUES_THYROID_CARCINOMA_POORLY_DIFF ERENTIATED_DN	-0.2573	0.0303
REACTOME_GAP_JUNCTION_DEGRADATION	-0.2572	0.0304
BROWNE_HCMV_INFECTION_24HR_DN	-0.2572	0.0304
TIAN_TNF_SIGNALING_NOT_VIA_NFKB	-0.2571	0.0305
LEE_NEURAL_CREST_STEM_CELL_UP	-0.2567	0.0307
NEBEN_AML_WITH_FLT3_OR_NRAS_DN	0.2563	0.031
NIELSEN_LEIOMYOSARCOMA_DN	-0.2547	0.0321
KEGG_TIGHT_JUNCTION	-0.2546	0.0322
REACTOME_SIGNALING_BY_EGFR_IN_CANCER	-0.2539	0.0326
FIGUEROA_AML_METHYLATION_CLUSTER_1_UP	-0.2531	0.0332
INGRAM_SHH_TARGETS	-0.253	0.0332
PIONTEK_PKD1_TARGETS_DN	0.2529	0.0334
KEGG_LONG_TERM_DEPRESSION	-0.2527	0.0335
THUM_SYSTOLIC_HEART_FAILURE_DN	-0.2523	0.0338
KINSEY_TARGETS_OF_EWSR1_FLII_FUSION_DN	-0.2523	0.0338
MOOTHA_PYR	-0.2522	0.0339
IWANAGA_CARCINOGENESIS_BY_KRAS_DN	-0.2518	0.0341
IVANOVA_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_LONG_TE RM	-0.2517	0.0342
REACTOME_TRAFFICKING_OF_AMPA_RECEPTORS	-0.2514	0.0344
KEGG_PENTOSE_PHOSPHATE_PATHWAY	0.2512	0.0346
REACTOME_DEVELOPMENTAL_BIOLOGY	-0.2511	0.0346
VANTVEER_BREAST_CANCER_ESR1_DN	0.2511	0.0347
BIOCARTA_MET_PATHWAY	-0.2506	0.0351
KEGG_PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTE M	-0.2505	0.0351
PID_LYMPH_ANGIOGENESIS_PATHWAY	-0.2505	0.0351
BROWNE_HCMV_INFECTION_24HR_UP	0.2504	0.0352
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_LB_UP	-0.2503	0.0353
COURTOIS_SENESCENCE_TRIGGERS	0.2502	0.0353
CHEN_HOXA5_TARGETS_6HR_UP	-0.2502	0.0353
CUI_TCF21_TARGETS_DN	-0.2499	0.0356
REACTOME_FACILITATIVE_NA_INDEPENDENT_GLU COSE_TRANSPORTERS	0.2496	0.0358
WONG_ENDMETRIUM_CANCER_DN	-0.2496	0.0358

REACTOME_CELL_EXTRACELLULAR_MATRIX_INTERACTIONS	-0.2495	0.0359
DER_IFN_ALPHA_RESPONSE_DN	-0.2494	0.036
DARWICHE_PAPILLOMA_PROGRESSION_RISK	0.249	0.0363
BREUHAHN_GROWTH_FACTOR_SIGNALING_IN_LIVER_CANCER	-0.2489	0.0364
REACTOME_NITRIC_OXIDE_STIMULATES_GUANYLATE_CYCLASE	-0.2488	0.0364
FIGUEROA_AML_METHYLATION_CLUSTER_3_UP	-0.2485	0.0366
LIU_IL13_MEMORY_MODEL_DN	0.2478	0.0372
MCCLUNG_DELTA_FOSB_TARGETS_2WK	-0.2476	0.0374
REACTOME_CDC6_ASSOCIATION_WITH_THE_ORC_ORIGIN_COMPLEX	0.2473	0.0376
PID_CDC42_REG_PATHWAY	-0.2472	0.0376
VERRECCHIA_RESPONSE_TO_TGFB1_C3	-0.2472	0.0376
HALMOS_CEBPA_TARGETS_DN	-0.2471	0.0378
BIOCARTA_HER2_PATHWAY	-0.2469	0.0379
RODRIGUES_THYROID_CARCINOMA_ANAPLASTIC_DN	-0.2467	0.0381
BIOCARTA_SPRY_PATHWAY	-0.2466	0.0382
HU_GENOTOXIC_DAMAGE_24HR	0.246	0.0387
PRAMOONJAGO_SOX4_TARGETS_DN	0.2455	0.0391
GAUSSMANN_MLL_AF4_FUSION_TARGETS_C_UP	-0.2452	0.0393
CHESLER_BRAIN_D6MIT150_QTL_CIS	-0.2449	0.0396
TAGHAVI_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION	-0.2445	0.0398
BONOME_OVARIAN_CANCER_SURVIVAL_SUBOPTIMAL_DEBULKING	-0.2445	0.0399
SANA_TNF_SIGNALING_DN	-0.2442	0.0402
REACTOME_ADENYLATE_CYCLASE_ACTIVATING_PATHWAY	-0.2439	0.0404
DANG_MYC_TARGETS_UP	0.2436	0.0406
BURTON_ADIPOGENESIS_10	-0.2436	0.0407
SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_A_DN	0.2434	0.0408
VANTVEER_BREAST_CANCER_BRCA1_UP	0.2432	0.041
AFFAR_YY1_TARGETS_UP	-0.2431	0.0411
CHUNG_BLISTER_CYTOTOXICITY_UP	0.2427	0.0414
TURASHVILI_BREAST_NORMAL_DUCTAL_VS_LOBULAR_UP	-0.2427	0.0414
HASLINGER_B_CLL_WITH_13Q14_DELETION	-0.2426	0.0415
SMID_BREAST_CANCER_RELAPSE_IN_LUNG_DN	-0.2418	0.0422
BIOCARTA_CARDIACEGF_PATHWAY	-0.2415	0.0425

HUMMERICH_SKIN_CANCER_PROGRESSION_DN	-0.2413	0.0426
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	-0.2412	0.0427
REACTOME_HORMONE_SENSITIVE_LIPASE_HSL_MEDIATED_TRIACYLGLYCEROL_HYDROLYSIS	-0.2409	0.043
NAKAMURA_LUNG_CANCER_DIFFERENTIATION_MARKERS	0.2403	0.0436
SHIN_B_CELL_LYMPHOMA_CLUSTER_9	0.2403	0.0436
REACTOME_TAK1_ACTIVATES_NFKB_BY_PHOSPHORYLATION_AND_ACTIVATION_OF_IKKS_COMPLEX	0.2402	0.0436
SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP	0.2401	0.0437
REACTOME_ABORTIVE_ELONGATION_OF_HIV1_TRANSCRIPT_IN_THE_ABSENCE_OF_TAT	0.2399	0.0439
MARTENS_TRETINOIN_RESPONSE_DN	0.2399	0.0439
LEE_METASTASIS_AND_ALTERNATIVE_SPLICING_DN	-0.2397	0.044
PEREZ_TP53_AND_TP63_TARGETS	-0.2394	0.0444
REACTOME_NGF_SIGNALLING_VIA_TRKA_FROM_THE_PLASMA_MEMBRANE	-0.2392	0.0445
RAY_TUMORIGENESIS_BY_ERBB2_CDC25A_DN	-0.2392	0.0446
BURTON_ADIPOGENESIS_9	-0.2391	0.0446
NAKAMURA_ADIPOGENESIS_LATE_UP	-0.2391	0.0446
REACTOME_MRNA_3_END_PROCESSING	0.239	0.0447
VALK_AML_CLUSTER_8	-0.2386	0.0451
KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	0.2384	0.0453
WANG_NFKB_TARGETS	-0.2382	0.0455
FIGUEROA_AML_METHYLATION_CLUSTER_2_UP	-0.2381	0.0455
REACTOME_REGULATION_OF_INSULIN_SECRETION_BY_ACETYLCHOLINE	-0.2378	0.0458
ZERBINI_RESPONSE_TO_SULINDAC_UP	-0.2377	0.0459
REACTOME_NEUROTRANSMITTER_RECEPTOR_BINDING_AND_DOWNSTREAM_TRANSMISSION_IN_THE_POSTSYNAPTIC_CELL	-0.2377	0.046
KANG_IMMORTALIZED_BY_TERT_DN	-0.2376	0.046
CAIRO_LIVER_DEVELOPMENT_UP	-0.2376	0.0461
PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_DN	-0.2375	0.0461
CHEBOTAEV_GR_TARGETS_DN	-0.2374	0.0462
UZONYI_RESPONSE_TO_LEUKOTRIENE_AND_THROMBIN	-0.2374	0.0462
BIOCARTA_INSULIN_PATHWAY	-0.2373	0.0463
BIOCARTA_BAD_PATHWAY	-0.2373	0.0463
CHICAS_RB1_TARGETS_CONFLUENT	-0.2372	0.0464

REACTOME_SEMA4D_INDUCED_CELL_MIGRATION _AND_GROWTH_CONE_COLLAPSE	-0.2364	0.0472
PICCALUGA_ANGIOIMMUNOBLASTIC_LYMPHOMA _DN	-0.2363	0.0473
PID_BETA_CATENIN_NUC_PATHWAY	-0.2362	0.0474
ZEMBUTSU_SENSITIVITY_TO_FLUOROURACIL	0.2357	0.0479
WANG_RESPONSE_TO_PACLITAXEL_VIA_MAPK8_D N	-0.2357	0.0479
NAGASHIMA_EGF_SIGNALING_UP	-0.2355	0.048
HEDENFALK_BREAST_CANCER_BRACX_DN	0.2352	0.0484
WONG_ADULT_TISSUE_STEM_MODULE	-0.2351	0.0485
MCCLUNG_CREB1_TARGETS_UP	-0.235	0.0486
ODONNELL_METASTASIS_UP	-0.2345	0.049
BIOCARTA_BARR_MAPK_PATHWAY	-0.2343	0.0493
BAKKER_FOXO3_TARGETS_DN	0.2341	0.0494
REACTOME_SIGNALING_BY_FGFR_IN_DISEASE	-0.234	0.0495
GOBERT_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION_D N	-0.2337	0.0498
UDAYAKUMAR_MED1_TARGETS_DN	-0.2337	0.0498
KANG_AR_TARGETS_UP	-0.2337	0.0498
BHAT_ESR1_TARGETS_VIA_AKT1_DN	-0.2336	0.05

9. RESUMEN

En el presente trabajo se ha pretendido mostrar la contribución de los microarrays de expresión génica (MAGE) a la definición del PET/CT como un biomarcador cualificado de respuesta temprana en pacientes metastáticos.

Es conocido que la proliferación de las células cancerosas consume una elevada cantidad de glucosa, que es convertida en lactato aún en presencia de oxígeno (efecto Warburg). Este efecto ha sido útil para detectar tumores metabólicamente activos mediante FDG-PET/CT, aunque su uso en la determinación de la respuesta temprana es aún controvertido. Además, los mecanismos moleculares que condicionan la captación de FDG por parte de la célula tumoral no están completamente esclarecidos. En este estudio se han utilizado los MAGE para identificar los genes más relevantes implicados en la captación de FDG en pacientes con metástasis de diferente histología.

Para ello se realizaron MAGE sobre biopsias congeladas de tumor y la cuantificación del SUV mediante FDG-PET/CT en la misma localización metastática biopsiada, con un intervalo máximo de 8 semanas y antes de comenzar el tratamiento. Se seleccionaron aquellas sondas más representativas por su contribución positiva o negativa con el SUV, generándose con ellas un modelo de predicción de basado en PLS-3, método éste entre los probados que producía menor RMSE. Adicionalmente se realizó la interpretación de los fenómenos biológicos (IBP) derivados de los genes seleccionados se hizo mediante distintos recursos bioinformáticos públicos disponibles.

En este trabajo se incluyeron 71 pacientes en el *training set* y 13 en el *validation set*, todos ellos con metástasis de diferente origen histológico. Finalmente se seleccionaron las 909 sondas que mejor se correlacionaron con SUV, estableciendo el umbral del coeficiente de regresión seleccionado que fue de ≤ -1 y $\geq +1$ mediante *10-fold CV* (resultando 333 con CR positivo y 576 con CR negativo). Se confeccionó una firma genómica de FDG basada en estas 909 sondas mediante PLS-3, calculándose un RMSE de 0.645 para el *validation set* con los datos de SUV medidos

(resultado éste comprendido dentro del 95% CI de RMSE determinado para el modelo inicial mediante *10-fold CV* x5).

En los estudios bioinformáticos realizados en los genes seleccionados para la elaboración del modelo predictivo del SUV, se ha constatado que una interpretación más completa de los distintos aspectos de la biología asociada a la captación de FDG en tumores metastásicos requiere de la utilización combinada y complementaria de distintos recursos bioinformáticos, no siendo posible que ninguno de ellos por sí solo sea capaz de aportar una perspectiva completa del fenómeno biológico complejo que es el SUV, que requiere de un notable número de genes para su predicción.

En la interpretación del significado biológico de las subredes de genes con correlación positiva o negativa con el SUV se deduce que, en condiciones de abundancia de glucosa (SUV alto) predominarían los procesos biológicos tumorales: procesamiento del mRNA y del tRNA, la biogénesis de ribosomas, el procesamiento de proteínas, la proliferación celular, la respuesta inmune y un metabolismo energético aumentado. Sin embargo en situaciones de escasez de glucosa (SUV bajo), predominarían los procesos biológicos del microambiente encaminados a proporcionar un mayor aporte de glucosa al tumor, como son los fenómenos de adhesión y de reorganización del citoesqueleto, de vasculogénesis y angiogénesis, de finalización de la transcripción, de motilidad celular y de transporte intracelular, de activación de vías de señalización de E-cadherina y fenómenos de autofagia.

En este trabajo se ha confeccionado la primera firma genómica publicada realizada en pacientes metastásicos que predice adecuadamente la captación de FDG. Tal y como se desprende de estos resultados, se confirma que la captación de FDG es un fenómeno complejo que involucra múltiples procesos biológicos, apuntando al valor de la PET/CT en la respuesta temprana.

Palabras clave: MAGE, firma genómica de FDG, PLS, cuantificación FDG PET/CT, biomarcador de respuesta precoz, Warburg.

Keywords: MAGE, FDG signature, PLS, quantitative FDG PET/CT, biomarker of early response, Warburg.

10. ABSTRACT

Title: Contribution of microarrays of gene expression (MAGE) to the definition of PET/CT as a qualified biomarker of early response in metastatic patients.

Introduction: Proliferating cancer cells consume elevated quantity of glucose, converted into lactate regardless the presence of oxygen (Warburg effect). This effect has been useful for imaging metabolically active tumors with FDG-PET, although its use in early response is controversial. Molecular mechanisms of FDG uptake are not fully understood. We have used MAGE to determine the most relevant genes involved in FDG uptake.

Material and Methods: Fresh-frozen tumor biopsies and quantitative basal FDG-PET/CT were obtained from metastatic lesions in cancer patients. Total tumor RNA was hybridized to a whole human genome oligonucleotide microarray. Gene expression signature-based prediction, using the most relevant genes involved in FDG uptake measured by SUV, was finally determined by Partial Least Squares (PLS). The interpretation of biological phenomena (IBP) derived from the selected genes was made by means of different public statistical bioinformatics resources.

Results: 71 patients with different histological diagnosis were included in the training cohort and 13 in the validation one. 909 probes correlated significantly with SUV: 333 positively and 576 negatively. A predictive signature based on these 909 probes was built using PLS-3, with an RMSE in validation set of 0.645 (within the 95% CI of RMSE determined in the training set). In IBP, other biological processes were more relevant than glycolysis in FDG uptake: RNA processing, ribosome biogenesis, protein processing, cell adhesion, cytoskeleton organization, angiogenesis and autophagy.

Conclusions: Based on the univariate regression coefficient, the 909 probes, with the highest absolute values as related to the SUV, were selected to build a predictive signature. PLS-3-built signature is the first reported in metastatic tumors that can accurately predict SUV. FDG uptake is a complex phenomenon that

involves multiple biological processes, confirming the value of PET/CT in early response.

11. ABREVIATURAS UTILIZADAS

10-fold CV	10-fold cross-validation
ACYL	ATP citrato liasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
BSA	Body surface area
CA	Corrección de atenuación
CP	Coeficiente de correlación de Pearson
CV	Coeficientes de variación
ECF	Event correction factor
EORTC	The European Organisation for Research and Treatment of Cancer
F-1,6-P2	Fructosa-1,6-bifosfato
F-6-P	Fructosa 6-Fosfato
GSEA	Gene set enrichment analysis
HCFA	Health Care Financing Administration
HIF-1	Factor inducible de hipoxia 1
HK	Hexoquinasa
LBM	Lean body mass
LDH-A	Lactato deshidrogenasa A
MAGE	Microarrays de expresión génica
mRNA	RNA mensajero
MTV	Metabolic Tumor Volume
NCI	National Cancer Institute
ORP150	Proteína reguladora de oxígeno 150
PCR	Principal component regression
PDH	Piruvato deshidrogenasa mitocondrial
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFK	Fosfofructoquinasa
PFKFB3	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa-3
PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1
PK	Piruvato kinasa
PLS	Partial least squares
R ²	R squared
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RF	Random forest
RIN	RNA integrity number

RMSE	Root mean squared error
ROI	Region of interest
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosómico
ssGSEA	Single sample GSEA
SUV	Standardized uptake value
SVM	Support vector machines
T/N	Cociente actividad del tumor y actividad de fondo
TLG	Total Lesion Glycosis
tRNA	RNA de transferencia
UPICT	The Uniform Protocols for Imaging in Clinical Trials
VEGFR	Receptores de VEGF
VOI	Volume of interest
WGV	Weighted gene voting

12. LISTA DE FIGURAS

Figura 1	El cambio del modelo energético, la evasión del control inmune y el microambiente tumoral son las tres señas de identidad de nueva incorporación en cáncer [2a].....	10
Figura 2	Glicólisis en la célula tumoral [6].....	12
Figura 3	Glicólisis mostrando destinos del piruvato (A), y fenotipos tumorales glicolítico (B) y respiratorio (C) [12].....	13
Figura 4	Factores de crecimiento y de regulación de la vía AMPK que conducen a un aumento de expresión de HIF-1 [11].....	14
Figura 5	Esquemas de las vías metabólicas presentes en los fibroblastos quiescentes (a) y en los activados respectivamente (b) [8].....	15
Figura 6	Imagen del tomógrafo PET/CT del Hospital Quironsalud Torrevieja.	17
Figura 7	Esquema del metabolismo intracelular de la FDG y la glucosa.....	18
Figura 8	FDG PET/CT: Imagen coronal de paciente con cáncer de mama que muestra adenopatías patológicas axilares y mediastínicas.....	19
Figura 9	Representación del porcentaje de reducción del SUV en función de la evolución clínica y el tiempo transcurrido desde cada ciclo de tratamiento. PD: progresión de la enfermedad; SD: enfermedad estable; PR: respuesta parcial; CR: respuesta completa [36].....	26
Figura 10	Porcentajes de reducción del SUV en pacientes en respuesta [36].....	27
Figura 11	Representación típica de los resultados de un MAGE. Matriz de 45 genes asociados con la supervivencia en cáncer renal [120].....	30
Figura 12	Entorno de trabajo para cuantificación mediante la estación Leonardo (Siemens Medical Solutions).....	39
Figura 13	<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> : equipo y ejemplo de datos obtenidos.....	42
Figura 14	<i>Agilent G2505B Microarray Scanner</i>	42
Figura 15	Secuencia de marcaje, hibridación y obtención de datos del microarray.....	44
Figura 16	Imágenes coronales y axiales en un paciente con afectación peritoneal masiva.....	56
Figura 17	<i>Heatmap</i> del <i>training set</i> . En las hileras del gráfico se representan las 909 sondas empleadas y en las columnas las muestras correspondientes a los 71 pacientes.....	57
Figura 18	Supervivencia de la serie de pacientes de cáncer primario de mama agrupando los pacientes en los 5 <i>clusters</i> determinados en el <i>training set</i>	59

Figura 19	En el área 1 se muestran enzimas relacionadas con el procesamiento de proteínas (proteínas enlazadas: 17; interacciones encontradas: 34; interacciones esperadas: 1; <i>p-value</i> : 0). En el área 2 aparecen enzimas involucradas en la preparación del pre-mRNA (proteínas enlazadas: 6; interacciones encontradas: 11; interacciones esperadas: 0; <i>p-value</i> : 9.34×10^{-10}).....	64
Figura 20	En el área 3 se muestran enzimas relacionadas con la biogénesis de ribosomas (proteínas enlazadas: 10; interacciones encontradas: 29; interacciones esperadas: 0; <i>p-value</i> : 0). En el área 4 enzimas de la glicólisis (proteínas enlazadas: 3; interacciones encontradas: 3; interacciones esperadas: 0; <i>p-value</i> : 3.69×10^{-6}).....	65
Figura 21	Mapa de interacción de proteínas de adhesión y citoesqueleto del <i>cluster</i> con mayor número de proteínas entre los genes que se asocian negativamente con el SUV (proteínas enlazadas: 42; interacciones encontradas: 64; interacciones esperadas: 8; <i>p-value</i> : 0).....	66
Figura 22	En el área 6 se muestran proteínas ribosomales y de finalización de la translación proteica (proteínas enlazadas: 10; interacciones encontradas: 35; interacciones esperadas: 2; <i>p-value</i> : 0). En el área 7 enzimas relacionados con procesos de autofagia (proteínas enlazadas: 8; interacciones encontradas: 11; interacciones esperadas: 0; <i>p-value</i> : 0).....	67
Figura 23	Representación gráfica de las diferencias de RMSE con un intervalo de confianza del 0.992.....	70
Figura 24	Representación gráfica del error mínimo para PLS estimado mediante <i>10-fold CV x5</i>	71
Figura 25	Representación gráfica del error mínimo para PCR estimado mediante <i>10-fold CV x5</i>	71
Figura 26	Representación gráfica de las predicciones de SUV del PLS-3 contra los datos observados en la primera <i>10-fold CV</i>	72
Figura 27	Resultados del ajuste del modelo PLS de 3 componentes a los datos del <i>training set</i>	73
Figura 28	<i>Plot</i> de los residuales del modelo PLS de 3 componentes ajustado al <i>training set</i>	74
Figura 29	Adenopatía axilar de SUV_{med35} 1.96.....	77
Figura 30	Muestra el RMSE de acuerdo al número de sondas empleado con PLS-3.....	79
Figura 31	Muestra el porcentaje de la varianza del SUV de acuerdo al número de sondas empleado con PLS-3.....	79
Figura 32	MYC en su interacción con el ribosoma [154].....	89
Figura 33	La glicólisis regula la angiogénesis [157].....	93
Figura 34	Aportaciones de la autofagia a la célula tumoral [160].....	95
Figura 35	Evolución de la autofagia en la oncogénesis [160].....	96

13. LISTA DE TABLAS

Tabla I	Listado de procesos biológicos estudiados en pacientes con cáncer y sus respectivos radiofármacos PET. Abreviaturas: ER: expresión del receptor,*Cu: cobre radiactivo.....	20
Tabla II	Factores biológicos, técnicos y errores que afectan al SUV [30].....	22
Tabla III	Reproducibilidad del SUV recogida en la literatura.....	24
Tabla IV	Características de los pacientes incluidos en el <i>training set</i> según origen histológico y localización de la biopsia.....	53
Tabla V	Datos poblacionales y de cuantificación del <i>training y validation sets</i> ; media y rango. ¹ Mediana y rango. ² Datos perdidos: 3 en el <i>training set</i> y 1 en el <i>validation set</i>	55
Tabla VI	Resultados del SUV por <i>cluster</i> . ANOVA para diferencia de las medias de SUV estadísticamente significativa ($p=0.001$).....	58
Tabla VII	Resultados del test de Cox en la serie de pacientes de cáncer primario de mama agrupando los pacientes en los 5 <i>clusters</i>	60
Tabla VIII	Listado de los 30 primeros procesos biológicos del subgrupo de genes correlacionados positivamente con el SUV.....	61
Tabla IX	Listado de los 15 primeros procesos biológicos del subgrupo de genes correlacionados negativamente con el SUV.....	62
Tabla X	Nodos e interacciones (detectadas y esperadas) entre las proteínas generadas por los genes de correlación positiva y negativa con el SUV($p < 0.05$).....	63
Tabla XI	Medias y desviaciones standard para cada modelo de RMSE y R^2 ..	68
Tabla XII	Diferencias RMSE y R^2 entre los distintos modelos.....	69
Tabla XIII	Top 10 procesos biológicos relacionados con los <i>loading weights</i> de los genes más positivamente correlacionados con el SUV.....	75
Tabla XIV	Top 10 procesos biológicos relacionados con los <i>loading weights</i> de los genes más negativamente correlacionados con el SUV.....	75
Tabla XV	Datos histológicos de localización de la biopsia y cuantificación del <i>validation set</i> *Outlier.....	76
Tabla XVI	Resultados de predicción del SUV a partir del modelo y su comparación con el dato obtenido de la imagen PET.....	78
Tabla XVII	Valores de RMSE para la firma completa y reducidas en el <i>validation set</i>	80

Tabla XVIII	Coeficientes de regresión (CR) respecto del SUV de genes estudiados en la literatura y para los que se ha encontrado equivalente en el microarray utilizado en este trabajo.....	85
--------------------	--	----

14. REFERENCIAS

1. Wein House S, Warburg O, Burk D and Shade AL. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):267-9.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100:57-70.
- 2a. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
3. Sonnenschein C, Soto AM. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J Biosci*. 2013;38:651-663.
4. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123: 309-314.
5. Warmoes MO, Locasale JW () Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities. *Biochem Pharm*. 2014;92:12-21.
6. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807:568-576.
7. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol*. 2014; 41:195-216.
8. Ghesquière B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature*. 2014; 511:167-176.
9. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research : metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;59:167-181.
10. Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:3981-3999.
11. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18: 598-608.

12. Martínez Costa, O. Glicólisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. Encuentros en la biología. Revista on-line de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). 2015;8(154):37-39.
13. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 2016;16:635-649.
14. Jones T. The role of positron emission tomography within the spectrum of medical imaging. *Eur J Nucl Med*. 1996;23:207-211.
15. Jones T, Price P. Development and experimental medicine application of PET in oncology: a historical perspective. *Lancet Oncol*. 2012;13: e116-125.
16. Ito M, Lammertsma AA, Wise RJ, Bernardi S, Frackowiak RS, Heather JD, McKenzie CG, Thomas DG, Jones T. Measurement of regional cerebral blood flow and oxygen utilisation in patients with cerebral tumours using ¹⁵O and positron emission tomography: analytical techniques and preliminary results. *Neuroradiology* 1982; 23: 63–74.
17. Di Chiro G, DeLaPaz RL, Brooks RA, Sokoloff L, Kornblith PL, Smith BH, Patronas NJ, Kufta CV, Kessler RM, Johnston GS, Manning RG, Wolf AP. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [¹⁸F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 1982; 32: 1323–1329.
18. Rhodes CG, Wise RJ, Gibbs JM, Frackowiak RS, Hatazawa J, Palmer AJ, Thomas DG, Jones T. In vivo disturbance of the oxidative metabolism of glucose in human cerebral gliomas. *Ann Neurol* 1983; 14: 614–626.
19. Beaney RP, Lammertsma AA, Jones T, McKenzie CG, Halnan KE. Positron emission tomography for in-vivo measurement of regional blood flow, oxygen utilisation, and blood volume in patients with breast carcinoma. *Lancet* 1984; 1: 131–134.
20. Alavi JB, Alavi A, Chawluk J, Kushner M, Powe J, Hickey W, Reivich M. Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. *Cancer* 1988; 62: 1074–1078.
21. Gambhir SS, Czernin J, Schwimmer J, Silverman DH, Coleman RE, Phelps ME. A tabulated summary of the FDG PET literature. *J Nucl Med*. 2001 May;42(5 Suppl):1S-93S.
22. Weber WA. Positron emission tomography as an imaging biomarker. *J Clin Oncol*. 2006;24:3282-3292.

23. Fischer BM, Olsen MW, Ley CD, Klausen TL, Mortensen J, Højgaard L, Kristjansen PE. How few cancer cells can be detected by positron emission tomography? A frequent question addressed by an in vitro study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 ;33:697-702.

24. Fletcher JW, Djulbegovic B, Soares HP, Siegel BA, Lowe VJ, Lyman GH, Coleman RE, Wahl R, Paschold JC, Avril N, Einhorn LH, Suh WW, Samson D, Delbeke D, Gorman M, Shields AF. Recommendations on the use of F-18-FDG PET in oncology. *J Nucl Med*. 2008;49:480–508.

25. Delbeke D, Coleman RE, Guiberteau MJ, Brown ML, Royal HD, Siegel BA, Townsend DW, Berland LL, Parker JA, Hubner K, Stabin MG, Zubal G, Kachelriess M, Cronin V, Holbrook S. Procedure guideline for tumor imaging with 18F-FDG PET/CT 1.0. *J Nucl Med*. 2006;47:885–95.

26. Boellaard R1, O'Doherty MJ, Weber WA, Mottaghy FM, Lonsdale MN, Stroobants SG, Oyen WJ, Kotzerke J, Hoekstra OS, Pruim J, Marsden PK, Tatsch K, Hoekstra CJ, Visser EP, Arends B, Verzijlbergen FJ, Zijlstra JM, Comans EF, Lammertsma AA, Paans AM, Willemsen AT, Beyer T, Bockisch A, Schaefer-Prokop C, Delbeke D, Baum RP, Chiti A, Krause BJ. FDG PET and PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour PET imaging: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:181–200.

27. Boellaard R, Delgado-Bolton R, Oyen WJ, Giammarile F, Tatsch K, Eschner W, Verzijlbergen FJ, Barrington SF, Pike LC, Weber WA, Stroobants S, Delbeke D, Donohoe KJ, Holbrook S, Graham MM, Testanera G, Hoekstra OS, Zijlstra J, Visser E, Hoekstra CJ, Pruim J, Willemsen A, Arends B, Kotzerke J, Bockisch A, Beyer T, Chiti A, Krause BJ; European Association of Nuclear Medicine (EANM). FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42:328-354.

28. Pantel AR, Mankoff DA. Molecular imaging to guide systemic cancer therapy: Illustrative examples of PET imaging cancer biomarkers. *Cancer Lett*. 2016. [Epub ahead of print].

29. Lucignani G, Paganelli G, Bombardieri E. The use of standardized uptake values for assessing FDG uptake with PET in oncology: a clinical perspective. *Nucl Med Commun*. 2004;25:651-656.

30. Boellaard R, Oyen WJ, Hoekstra CJ, Hoekstra OS, Visser EP, Willemsen AT, Arends B, Verzijlbergen FJ, Zijlstra J, Paans AM, Comans EF, Pruim J. The Netherlands protocol for standardisation and quantification of FDG whole body PET studies in multi-centre trials. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:2320-2333.
31. Westerterp M, Pruim J, Oyen W, Hoekstra O, Paans A, Visser E, van Lanschot J, Sloof G, Boellaard R. Quantification of FDG PET studies using standardised uptake values in multi-centre trials: effects of image reconstruction, resolution and ROI definition parameters. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:392-404
32. Vanderhoek M, Perlman SB, Jeraj R. Impact of different standardized uptake value measures on PET-based quantification of treatment response. *J Nucl Med*. 2013 Aug;54(8):1188-1194
33. Keyes JW Jr. SUV: standard uptake or silly useless value?. *J Nucl Med*. 1995;36:1836-1839.
34. Zasadny KR, Wahl RL. Standardized uptake values of normal tissues at PET with 2-[fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: variations with body weight and a method for correction. *Radiology*. 1993;189(3):847-850.
35. Kim CK, Gupta NC, Chandramouli B, Alavi A. Standardized uptake values of FDG: body surface area correction is preferable to body weight correction. *J Nucl Med*. 1994;35:164-167.
36. Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, Pruim J, Price P. Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *Eur J Cancer*. 1999;35:1773-1782.
37. Shankar LK, Hoffman JM, Bacharach S, Graham MM, Karp J, Lammertsma AA, Larson S, Mankoff DA, Siegel BA, Van den Abbeele A, Yap J, Sullivan D; National Cancer Institute. Consensus recommendations for the use of 18F-FDG PET as an indicator of therapeutic response in patients in National Cancer Institute Trials. *J Nucl Med*. 2006;47:1059-1066.
38. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L,

Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247.

39. Wahl R.L, Jacene H., Kasamon Y., and Lodge M. A. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET Response Criteria in Solid Tumors.*J Nucl Med* 2009; 50:122S–150S.

40. Ho KC, Fang YD, Chung HW, Liu YC, Chang JW, Hou MM, Yang CT, Cheng NM, Su TP, Yen TC.TLG-S criteria are superior to both EORTC and PERCIST for predicting outcomes in patients with metastatic lung adenocarcinoma treated with erlotinib.*Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Jun 3. [Epub ahead of print]

41. Chang S, Koo PJ, Kwak JJ, Kim SJ.Changes in Total Lesion Glycolysis Evaluated by Repeated F-18 FDG PET/CT as Prognostic Factor in Locally Advanced Esophageal Cancer Patients Treated with Preoperative Chemoradiotherapy.*Oncology*. 2016;90:97-102.

42. Jiménez-Ballvé A, García García-Esquinas M, Salsidua-Arroyo O, Serrano-Palacio A, García-Sáenz JA, Ortega Candil A, Fuentes Ferrer ME, Rodríguez Rey C, Román-Santamaría JM, Moreno F, Carreras-Delgado JL.Prognostic value of metabolic tumour volume and total lesion glycolysis in 18F-FDG PET/CT scans in locally advanced breast cancer staging.*Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2016 Mar 2. [Epub ahead of print]

43. Lee JW, Heo EJ, Moon SH, Lee H, Cheon GJ, Lee M, Kim HS, Chung HH.Prognostic value of total lesion glycolysis on preoperative 18F-FDG PET/CT in patients with uterine carcinosarcoma.*Eur Radiol*. 2016 Feb 16. [Epub ahead of print]

44. Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP.Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab*. 2009;10:470-481.

45. Tannock IF. Cell proliferation. In: Tannock IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology*. New York:McGraw-Hill, 1992:154–177.

46. Meropol NJ, Schrag D, Smith TJ, Mulvey TM, Langdon RM Jr, Blum D, Ubel PA, Schnipper LE; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guidance statement: the cost of cancer care.*J Clin Oncol*. 2009;27:3868-3874.

47. Nishi A., Milner DA Jr., Giovannucci EL., Nishihara R., Tan AS., Kawachi I., Ogino S. Integration of molecular pathology, epidemiology and social science for global precision medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(1):11-23.
48. Michael F. Drummond and Anne R. Mason. European Perspective on the Costs and Cost-Effectiveness of Cancer Therapies. *J Clin Oncol.* 2007;25:191-195.
49. Erasmus JJ, Gladish GW, Broemeling L, Sabloff BS, Truong MT, Herbst RS, Munden RF. Interobserver and intraobserver variability in measurement of non-small-cell carcinoma lung lesions: implications for assessment of tumor response. *J Clin Oncol.* 2003;21:2574-2582.
50. FDG-PET/CT Technical Committee. FDG-PET/CT as an Imaging Biomarker Measuring Response to Cancer Therapy, Quantitative Imaging Biomarkers Alliance, Version 1.05, Publicly Reviewed Version. QIBA, December 11, 2013. Available from: RSNA.ORG/QIBA.
51. Wormanns D, Kohl G, Klotz E, et al. Volumetric measurements of pulmonary nodules at multi-row detector CT: in vivo reproducibility. *Eur Radiol* 2004; 14: 86-92.
52. Morgan B, Utting JF, Higginson A, Thomas AL, Steward WP, Horsfield MA. A simple, reproducible method for monitoring the treatment of tumours using dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Br J Cancer* 2006; 94: 1420-1427.
53. Avril NE, Weber WA. Monitoring response to treatment in patients utilizing PET. *Radiol Clin North Am.* 2005;43:189-204.
54. Graham MM, Wahl RL, Hoffman JM, Yap JT, Sunderland JJ, Boellaard R, Perlman ES, Kinahan PE, Christian PE, Hoekstra OS, Dorfman GS. Summary of the UPICT Protocol for 18F-FDG PET/CT Imaging in Oncology Clinical Trials. *J Nucl Med.* 2015;56:955-961.
55. Wieder HA, Brücher BL, Zimmermann F, et al. Time course of tumor metabolic activity during chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma and response to treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22:900-908.
56. Kurland BF, Doot RK, Linden HM, Mankoff DA, Kinahan PE. Multicenter trials using ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET to predict chemotherapy response: effects of differential measurement error and bias on power calculations for unselected and enrichment designs. *Clin Trials.* 2013;10:886-895.

57. Lasnon C, Desmots C, Quak E, Gervais R, Do P, Dubos-Arvis C, Aide N. Harmonizing SUVs in multicentre trials when using different generation PET systems: prospective validation in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40:985-996.
58. Doot RK, Pierce LA 2nd, Byrd D, Elston B, Allberg KC, Kinahan PE. Biases in Multicenter Longitudinal PET Standardized Uptake Value Measurements. *Transl Oncol*. 2014;7:48-54.
59. Weber WA, Gatsonis CA, Mozley PD, Hanna LG, Shields AF, Aberle DR, Govindan R, Torigian DA, Karp JS, Yu JQ, Subramaniam RM, Halvorsen RA, Siegel BA; ACRIN 6678 Research team; MK-0646-008 Research team. Repeatability of 18F-FDG PET/CT in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Prospective Assessment in 2 Multicenter Trials. *J Nucl Med*. 2015;56:1137-1143.
60. Kurland BF, Muzi M, Peterson LM, Doot RK, Wangerin KA, Mankoff DA, Linden HM, Kinahan PE. Multicenter Clinical Trials Using 18F-FDG PET to Measure Early Response to Oncologic Therapy: Effects of Injection-to-Acquisition Time Variability on Required Sample Size. *J Nucl Med*. 2016;57:226-230.
61. Romer W, Hanauske AR, Ziegler S, et al. Positron emission tomography in non-Hodgkin's lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 1998; 91: 4464-4471.
62. Smith I, Welch A, Hutcheon A, et al. Positron emission tomography using [18F]-fluorodeoxy-D-glucose to predict the pathologic response of breast cancer to primary chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:1676-1688.
63. Schelling M, Avril N, Nahrig J, et al. Positron emission tomography using [18F] fluorodeoxyglucose for monitoring primary chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1689-1695.
64. Dunleavy K, Mikhael G, Sehn LH, Hicks RJ, Wilson WH. The value of positron emission tomography in prognosis and response assessment in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51 Suppl 1:28-33.
65. Bussink J, van Herpen CM, Kaanders JH, Oyen WJ. PET-CT for response assessment and treatment adaptation in head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2010;11:661-669.

66. Lordick F. Optimizing neoadjuvant chemotherapy through the use of early response evaluation by positron emission tomography. *Recent Results Cancer Res.* 2012;196:201-211.
67. De Geus-Oei LF, Vriens D, Arens AI, Hutchings M, Oyen WJ. FDG-PET/CT based response-adapted treatment. *Cancer Imaging.* 2012;28;12:324-335.
68. Zhang C, Liu J, Tong J, Sun X, Song S, Huang G. 18F-FDG-PET evaluation of pathological tumour response to neoadjuvant therapy in patients with NSCLC. *Nucl Med Commun.* 2013;34:71-77.
69. Coughlan M, Elstrom R. The use of FDG-PET in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): predicting outcome following first line therapy. *Cancer Imaging.* 2014; 29;14:34.
70. Evens AM, Kostakoglu L. The role of FDG-PET in defining prognosis of Hodgkin lymphoma for early-stage disease. *Blood.* 2014;124:3356-3364.
71. Ott K, Schmidt T, Lordick F, Herrmann K. Importance of PET in surgery of esophageal cancer. *Chirurg.* 2014;85:505-512.
72. Siva S, Deb S, Young RJ, Hicks RJ, Callahan J, Bressel M, Mileskin L, Rischin D, Bernshaw D, Narayan K. ¹⁸F-FDG PET/CT following chemoradiation of uterine cervix cancer provides powerful prognostic stratification independent of HPV status: a prospective cohort of 105 women with mature survival data. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42:1825-32.
73. Tao CJ, Lin G, Xu YP, Mao WM. Predicting the Response of Neoadjuvant Therapy for Patients with Esophageal Carcinoma: an In-depth Literature Review. *J. Cancer.* 2015;6:1179-1186.
74. Byrne K, Siva S, Chait L, Callahan J, Bressel M, Seel M, MacManus MP, Hicks RJ. 15-Year Experience of ¹⁸F-FDG PET Imaging in Response Assessment and Restaging After Definitive Treatment of Merkel Cell Carcinoma. *J Nucl Med.* 2015;56:1328-1333.
75. Swinnen LJ, Li H, Quon A, Gascoyne R, Hong F, Ranheim EA, Habermann TM, Kahl BS, Horning SJ, Advani RH. Response-adapted therapy for aggressive non-Hodgkin's lymphomas based on early [¹⁸F] FDG-PET scanning: ECOG-ACRIN Cancer Research Group study (E3404). *Br J Haematol.* 2015;170:56-65.
76. Mehanna H, Wong WL, McConkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AG, Nutting C, Powell N, Al-Booz H, Robinson M, Junor E, Rizwanullah M, von

Zeidler SV, Wiesmann H, Hulme C, Smith AF, Hall P, Dunn J; PET-NECK Trial Management Group. PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374:1444-1454.

77. de Langen AJ, Vincent A, Velasquez LM, van Tinteren H, Boellaard R, Shankar LK, Boers M, Smit EF, Stroobants S, Weber WA, Hoekstra OS. Repeatability of 18F-FDG uptake measurements in tumors: a metaanalysis. *J Nucl Med*. 2012;53:701-708.

78. Weber WA. Use of PET for monitoring cancer therapy and for predicting outcome. *J Nucl Med*. 2005;46:983-995.

79. Larson SM, Schwartz LH. 18F-FDG PET as a candidate for "qualified biomarker": functional assessment of treatment response in oncology. *J Nucl Med*. 2006;47:901-903.

80. Weber WA, Figlin R. Monitoring cancer treatment with PET/CT: does it make a difference? *J Nucl Med*. 2007;48 Suppl 1:36S-44S.

81. Anderson H, Singh N, Miles K. Tumour response evaluation with fluorodeoxyglucose positron emission tomography: research technique or clinical tool? *Cancer Imaging*. 2010;10:S68-72.

82. Ulaner GA, Riedl CC, Dickler MN, Jhaveri K, Pandit-Taskar N, Weber W. Molecular Imaging of Biomarkers in Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2016 Feb;57 Suppl 1:53S-59S.

83. Langer A. A systematic review of PET and PET/CT in oncology: a way to personalize cancer treatment in a cost-effective manner?. *BMC Health Serv Res*. 2010 Oct 8;10:283.

84. Bradbury I, Bonell E, Boynton J, Cummins E, Facey K, Iqbal K, Laking G, McDonald C, Parpia T, Sharp P, Single A and Walker A. 2002. Positron emission tomography (PET) imaging in cancer management. Health Technology Assessment Report 2. Glasgow: Health Technology Board for Scotland.

85. Avril N, Menzel M, Dose J, Schelling M, Weber W, Jänicke F, Nathrath W, Schwaiger M. Glucose metabolism of breast cancer assessed by 18F-FDG PET: histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med*. 2001;42:9-16.

86. Adler LP, Crowe JP, al-Kaisi NK, Sunshine JL. Evaluation of breast masses and axillary lymph nodes with [F-18] 2-deoxy-2-fluoro-Dglucose PET. *Radiology* 1993;187:743-750.

87. Crippa F, Seregini E, Agresti R, Chiesa C, Pascali C, Bogni A, Decise D, De Sanctis V, Greco M, Daidone MG, Bombardieri E. Association between [18F]fluorodeoxyglucose uptake and postoperative histopathology, hormone receptor status, thymidine labelling index and p53 in primary breast cancer: a preliminary observation. *Eur J Nucl Med* 1998;25:1429–1434.

88. Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, van Der Groep P, van Diest PJ, Comans EF, Joshi U, Semenza GL, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Molthoff CF. Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol* 2002;20:379–387.

89. Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004;28:364–371.

90. Bormans GM, Van Oosterwyck G, De Groot TJ, Veyhl M, Mortelmans L, Verbruggen AM, Koepsell H. Synthesis and biologic evaluation of (11)cmethyl-D-glucoside, a tracer of the sodium-dependent glucose transporters. *J Nucl Med* 2003;44:1075–1081.

91. Brown RS, Goodman TM, Zasadny KR, Greenson JK, Wahl RL. Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nucl Med Biol* 2002;29:443–453.

92. de Geus-Oei LF, van Krieken JH, Aliredjo RP, Krabbe PF, Frielink C, Verhagen AF, Boerman OC, Oyen WJ. Biological correlates of FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;55:79–87.

93. Mamede M, Higashi T, Kitaichi M, Ishizu K, Ishimori T, Nakamoto Y, Yanagihara K, Li M, Tanaka F, Wada H, Manabe T, Saga T. [18F]FDG uptake and PCNA, Glut-1, and hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung. *Neoplasia* 2005;7:369–379.

94. Chung JK, Lee YJ, Kim SK, Jeong JM, Lee DS, Lee MC. Comparison of [18F]fluorodeoxyglucose uptake with glucose transporter-1 expression and proliferation rate in human glioma and non-small-cell lung cancer. *Nucl Med Commun* 2004;25:11–17.

95. Marom EM, Aloia TA, Moore MB, Hara M, Herndon JE 2nd, Harpole DH Jr, Goodman PC, Patz EF Jr. Correlation of FDG-PET imaging with Glut-1 and Glut-3 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;33:99–107.

96. Kurokawa T, Yoshida Y, Kawahara K, Tsuchida T, Okazawa H, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Kotsuji F. Expression of GLUT-1 glucose transfer, cellular proliferation activity and grade of tumor correlate with [F-18]-fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography in epithelial tumors of the ovary. *Int J Cancer* 2004;109:926–932.
97. Higashi T, Saga T, Nakamoto Y, Ishimori T, Mamede MH, Wada M, Doi R, Hosotani R, Imamura M, Konishi J. Relationship between retention index in dual-phase (18)F-FDG PET, and hexokinase-II and glucose transporter-1 expression in pancreatic cancer. *J Nucl Med* 2002;43:173–180
98. Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, Higuchi T, Nakajima T, Endo K. Expression of glucose transporters and hexokinase II in cholangiocellular carcinoma compared using [18F]-2-fluoro-2-deoxy-Dglucose positron emission tomography. *Cancer Sci* 2008;99:260–266.
99. Tohma T, Okazumi S, Makino H, Cho A, Mochiduki R, Shuto K, Kudo H, Matsubara K, Gunji H, Ochiai T. Relationship between glucose transporter, hexokinase and FDG-PET in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:486–490.
100. Tian M, Zhang H, Higuchi T, Oriuchi N, Nakasone Y, Takata K, Nakajima N, Mogi K, Endo K. Hexokinase-II expression in untreated oral squamous cell carcinoma: comparison with FDG PET imaging. *Ann Nucl Med* 2005;19:335–338.
101. Zhou X, Chen R, Xie W, Ni Y, Liu J, Huang G. Relationship between 18F-FDG accumulation and lactate dehydrogenase A expression in lung adenocarcinomas. *J Nucl Med*. 2014;55:1766-1771.
102. Nair VS, Gevaert O, Davidzon G, Plevritis SK, West R. NF- κ B protein expression associates with (18)F-FDG PET tumor uptake in non-small cell lung cancer: a radiogenomics validation study to understand tumor metabolism. *Lung Cancer*. 2014;83:189-196.
103. Alvarez JV, Belka GK, Pan TC, Chen CC, Blankemeyer E, Alavi A, Karp JS, Chodosh LA. Oncogene pathway activation in mammary tumors dictates FDG-PET uptake. *Cancer Res*. 2014;74:7583-7598.
104. Iwamoto M, Kawada K, Nakamoto Y, Itatani Y, Inamoto S, Toda K, Kimura H, Sasazuki T, Shirasawa S, Okuyama H, Inoue M, Hasegawa S, Togashi

K, Sakai Y. Regulation of ¹⁸F-FDG accumulation in colorectal cancer cells with mutated KRAS. *J Nucl Med.* 2014;55:2038-2044.

105. Morani F, Phadngam S, Follo C, Titone R, Aimaretti G, Galetto A, Alabiso O, Isidoro C. PTEN regulates plasma membrane expression of glucose transporter 1 and glucose uptake in thyroid cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 2014;53:247-258.

106. Smith TA, Sharma RI, Thompson AM, Paulin FE. Tumor ¹⁸F-FDG incorporation is enhanced by attenuation of P53 function in breast cancer cells in vitro. *J Nucl Med.* 2006;47:1525-1530.

107. Wilson GD, Thibodeau BJ, Fortier LE, Pruetz BL, Galoforo S, Baschnagel AM, Chunta J, Oliver Wong CY, Yan D, Marples B, Huang J. Glucose metabolism gene expression patterns and tumor uptake of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose after radiation treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;90:620-627.

108. Caino MC, Altieri DC. Molecular Pathways: Mitochondrial Reprogramming in Tumor Progression and Therapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22:540-545.

109. Xu H, Li B, Yu W, Wang H, Zhao X, Yao Y, Huang D. Correlation between ¹⁸F-FDG uptake and the expression of glucose transporter-1 and hypoxia-inducible factor-1 α in transplanted VX2 tumors. *Nucl Med Commun.* 2013;34:953-958.

110. Van Berkel A, Rao JU, Kusters B, Demir T, Visser E, Mensenkamp AR, van der Laak JA, Oosterwijk E, Lenders JW, Sweep FC, Wevers RA, Hermus AR, Langenhuijsen JF, Kunst DP, Pacak K, Gotthardt M, Timmers HJ. Correlation between in vivo ¹⁸F-FDG PET and immunohistochemical markers of glucose uptake and metabolism in pheochromocytoma and paraganglioma. *J Nucl Med.* 2014;55:1253-1259.

111. Park SG, Lee JH, Lee WA, Han KM. Biologic correlation between glucose transporters, hexokinase-II, Ki-67 and FDG uptake in malignant melanoma. *Nucl Med Biol.* 2012;39:1167-1172.

112. Zhang Y, Xu H, Wang H, Yu W, Zhao X, Xue Y. Fluorine-18-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography with Ki67 and GLUT-1 immunohistochemistry for evaluation of the radiosensitization effect of oleanolic acid on C6 rat gliomas. *Nucl Med Commun.* 2015;36:21-27

113. Khandani AH, Dunphy CH, Meteesatien P, Dufault DL, Ivanovic M, Shea TC. Glut1 and Glut3 expression in lymphoma and their association with tumor intensity on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Nucl Med Commun.* 2009;30:594-601.
114. Suzawa N, Ito M, Qiao S, Uchida K, Takao M, Yamada T, Takeda K, Murashima S. Assessment of factors influencing FDG uptake in non-small cell lung cancer on PET/CT by investigating histological differences in expression of glucose transporters 1 and 3 and tumour size. *Lung Cancer.* 2011;72:191-198.
115. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953;171:964-967.
116. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976;260:170-173.
117. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323:643-646.
118. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. (International Human Genome Sequencing Consortium). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409:860-921
119. International Human Genome Sequencing Consortium. Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004; 431:931-945.
120. Vasselli JR, Shih JH, Iyengar SR, Maranchie J, Riss J, Worrell R, Torres-Cabala C, Tabios R, Mariotti A, Stearman R, Merino M, Walther MM, Simon R, Klausner RD, Linehan WM. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:6958-6963.
121. Von Hoff DD, Stephenson JJ Jr, Rosen P, Loesch DM, Borad MJ, Anthony S, Jameson G, Brown S, Cantafio N, Richards DA, Fitch TR, Wasserman E, Fernandez C, Green S, Sutherland W, Bittner M, Alarcon A, Mallery D, Penny R. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J Clin Oncol.* 2010;28:4877-4883.

122. Rebollo J, Sureda M, Martinez EM, Fernández-Morejón FJ, Farré J, Muñoz V, Fernández-Latorre F, Manzano RG, Brugarolas A. Gene Expression Profiling of Tumors From Heavily Pretreated Patients With Metastatic Cancer for the Selection of Therapy: A Pilot Study. *Am J Clin Oncol*. 2014 Aug 20. [Epub ahead of print]
123. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001; 412:822–826
124. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:811–816.
125. Schaner ME, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, Wang YC, Duran GE, Sikic TL, Caldeira S, Skomedal H, Tu IP, Hernandez-Boussard T, Johnson SW, O'Dwyer PJ, Fero MJ, Kristensen GB, Borresen-Dale AL, Hastie T, Tibshirani R, van de Rijn M, Teng NN, Longacre TA, Botstein D, Brown PO, Sikic BI. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:4376–4386.
126. Sorlie T, Perou C, Brown P, Botstein D, Borresen-Dale A. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:10869–10874.
127. Sotiriou C. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:10393–10398.
128. Garber ME. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:13784–13789.
129. Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, et al. Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet*. 2004; 363:775–781.
130. West RB, van de Rijn M. The role of microarray technologies in the study of soft tissue tumours. *Histopathology*. 2006; 48:22–31.

131. Tinker AV, Boussioutas A, Bowtell DDL. The challenges of gene expression microarrays for the study of human cancer. *Cancer Cell*. 2006; 9:333–339.
132. Wadlow R, Ramaswamy S. DNA microarrays in clinical cancer research. *Curr Mol Med*. 2005; 5:111–120.
133. Alam MM, Lal S, FitzGerald KE, Zhang L. A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clin Transl Med*. 2016;5:3.
134. Rajeshkumar NV, Dutta P, Yabuuchi S, de Wilde RF, Martinez GV, Le A, Kamphorst JJ, Rabinowitz JD, Jain SK, Hidalgo M, Dang CV, Gillies RJ, Maitra A. Therapeutic Targeting of the Warburg Effect in Pancreatic Cancer Relies on an Absence of p53 Function. *Cancer Res*. 2015 Aug 15;75(16):3355-3364.
135. Mawlawi O, Erasmus JJ, Munden RF, Pan T, Knight AE, Macapinlac HA, Podoloff DA, Chasen M. Quantifying the effect of IV contrastmedia on integrated PET/CT: clinical evaluation. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;186:308–319
136. Krak NC, Boellaard R, Hoekstra OS, Twisk JW, Hoekstra CJ, Lammertsma AA. Effects of ROI definition and reconstruction method on quantitative outcome and applicability in a response monitoring trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:294-301
137. Frings V, de Langen AJ, Smit EF, van Velden FH, Hoekstra OS, van Tinteren H, Boellaard R. Repeatability of metabolically active volume measurements with 18F-FDG and 18F-FLT PET in non-small cell lung cancer. *J Nucl Med*. 2010;51:1870–1877.
138. Boellaard R, Krak NC, Hoekstra OS, Lammertsma AA. Effects of noise, image resolution, and ROI definition on the accuracy of standard uptake values: a simulation study. *J Nucl Med*. 2004;45:1519–1527
139. Janmahasatian S, Duffull SB, Ash S, Ward LC, Byrne NM, Green B. Quantification of lean bodyweight. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44:1051–1065
140. Lee SM, Kim TS, Lee JW, Kim SK, Park SJ, Han SS. Improved prognostic value of standardized uptake value corrected for blood glucose level in pancreatic cancer using F-18 FDG PET. *Clin Nucl Med*. 2011;36:331-6.
141. Hastie T, Tibshirani R and Friedman J. *The Elements of Statistical Learning, Data Mining Inference and Prediction*, Second Edition. Springer Series in

Statistics 2009. Chapter 18: High dimensional problems: $p \gg N$. 18.6 High-dimensional regression: supervised principal components: 677-683.

142. Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, Bontempi G, Quackenbush J, Sotiriou C. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:311-325.

143. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Fröhling S, Chan EM, Sos ML, Michel K, Mermel C, Silver SJ, Weir BA, Reiling JH, Sheng Q, Gupta PB, Wadlow RC, Le H, Hoersch S, Wittner BS, Ramaswamy S, Livingston DM, Sabatini DM, Meyerson M, Thomas RK, Lander ES, Mesirov JP, Root DE, Gilliland DG, Jacks T, Hahn WC. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature.* 2009;462:108-112.

144. Hastie T, Tibshirani R and Friedman J. *The Elements of Statistical Learning, Data Mining Inference and Prediction, Second Edition.* Springer Series in Statistics 2009. Chapter 3: Linear methods of regression. 3.5 Methods using derived input directions: 79 – 82.

145. Hastie T, Tibshirani R and Friedman J. *The Elements of Statistical Learning, Data Mining Inference and Prediction, Second Edition.* Springer Series in Statistics 2009. Chapter 15: Random forest: 587-604.

146. Hastie T, Tibshirani R and Friedman J. *The Elements of Statistical Learning, Data Mining Inference and Prediction, Second Edition.* Springer Series in Statistics 2009. Chapter 12: Support vector machines and flexible discriminants: 434-438.

147. Efron, B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist.* 1979 ;7:1-26.

148. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:D447-452

149. Gevaert O, Xu J, Hoang CD, Leung AN, Xu Y, Quon A, Rubin DL, Napel S, Plevritis SK. Non-small cell lung cancer: identifying prognostic imaging biomarkers by leveraging public gene expression microarray data-methods and preliminary results. *Radiology.* 2012; 264: 387-396.

150. Palaskas N, Larson SM, Schultz N, Komisopoulou E, Wong J, Rohle D, Campos C, Yannuzzi N, Osborne JR, Linkov I, Kastenhuber ER, Taschereau R, Plaisier SB, Tran C, Heguy A, Wu H, Sander C, Phelps ME, Brennan C, Port E, Huse JT, Graeber TG, Mellinger IK. 18F-fluorodeoxy-glucose positron emission tomography marks MYC-overexpressing human basal-like breast cancers. *Cancer Res.* 2011 Aug 1;71(15):5164-5174.
151. Nair VS, Gevaert O, Davidzon G, Napel S, Graves EE, Hoang CD, Shrager JB, Quon A, Rubin DL, Plevritis SK. Prognostic PET 18F-FDG uptake imaging features are associated with major oncogenomic alterations in patients with resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2012;72:3725-3734.
152. Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol.* 2008;173:301-310.
153. Chi V, Dang. MYC on the Path to Cancer. *Cell.* 2012; 149: 22–35.
154. Zachary E, Stine, Zandra E, Walton, Brian J, Altman, Annie L, Hsieh, Chi V, Dang. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* 2015; 5: 1024–1039.
155. Montanaro L, Treré D, Derenzini M. The emerging role of RNA polymerase I transcription machinery in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther.* 2013;6:909-916.
156. Drygin D, O'Brien SE, Hannan RD, McArthur GA, Von Hoff DD. Targeting the nucleolus for cancer-specific activation of p53. *Drug Discov Today.* 2014;19:259-265
157. Jang C, Arany Z. Metabolism: Sweet enticements to move. *Nature.* 2013;500:409-411.
158. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuysen B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell.* 2013;154:651-663.
159. Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J, Bifari F, Wang

X, Blanco R, Tembuysen B, Cornelissen I, Bouché A, Vinckier S, Diaz-Moralli S, Gerhardt H, Telang S, Cascante M, Chesney J, Dewerchin M, Carmeliet P. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab.* 2014;19 :37-48

160. Lorenzo Galluzzi, Federico Pietrocola, José Manuel Bravo-San Pedro, Ravi K Amaravadi, Eric H Baehrecke, Francesco Cecconi, Patrice Codogno, Jayanta Debnath, David A Gewirtz, Vassiliki Karantza, Alec Kimmelman, Sharad Kumar, Beth Levine, Maria Chiara Maiuri, Seamus J Martin, Josef Penninger, Mauro Piacentini, David C Rubinsztein, Hans-Uwe Simon, Anne Simonsen, Andrew M Thorburn, Guillermo Velasco, Kevin M Ryan, Guido Kroemer. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015; 34: 856–880.

161. Claudia Capparelli, Carmela Guido, Diana Whitaker-Menezes, Gloria Bonuccelli, Renee Balliet, Timothy G. Pestell, Allison F. Goldberg, Richard G. Pestell, Anthony Howell, Sharon Sneddon, Ruth Birbe, Aristotelis Tsirigos, Ubaldo Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia, Michael P. Lisanti. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle.* 2012; 11: 2285–2302.

162. Yu C, Wan W, Zhang B, Deng S, Yen TC, Wu Y. Evaluation of the relationship between [18F]FDG and P-glycoprotein expression: an experimental study. *Nucl Med Biol.* 2012;39:671-678.

163. Gao YY, Liu BQ, Du ZX, Zhang HY, Niu XF, Wang HQ. Implication of oxygen-regulated protein 150 (ORP150) in apoptosis induced by proteasome inhibitors in human thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:E319-326.

164. Stojadinovic A, Hooke JA, Shriver CD, Nissan A, Kovatich AJ, Kao TC, Ponniah S, Peoples GE, Moroni M. HYOU1/Orp150 expression in breast cancer. *Med Sci Monit.* 2007;13:BR231-239.

165. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R, Nenutil R, Sachlova M, Kocakova I, Michalek J, Smerdova T, Knoflickova D, Vyzula R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep.* 2009;21:1235–1241

166. Kusaczuk M, Cechowska-Pasko M. Molecular chaperone ORP150 in ER stress-related diseases. *Curr Pharm Des.* 2013;19:2807-2818.
167. Zhou Y, Liao Q, Li X, Wang H, Wei F, Chen J, Yang J, Zeng Z, Guo X, Chen P, Zhang W, Tang K, Li X, Xiong W, Li G. HYOU1, Regulated by LPLUNC1, Is Up-Regulated in Nasopharyngeal Carcinoma and Associated with Poor Prognosis. *J Cancer.* 2016;7:367-376.
168. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ, Hu W, Feng Z. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun.* 2013;4:2935.
169. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006;126:107-120.
170. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8)
171. Jeltsch M, Leppänen VM, Saharinen P, Alitalo K. Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9)
172. Hastie T, Tibshirani R and Friedman J. *The Elements of Statistical Learning, Data Mining Inference and Prediction, Second Edition.* Springer Series in Statistics 2009. Chapter 2: Overview of Supervised Learning. 2.9 Model Selection and the Bias–Variance Tradeoff: 37–38.

15. PUBLICACIONES Y CONGRESOS

1. Determinación del SUV umbral óptimo para la determinación de volúmenes de tratamiento sobre imágenes PET-TAC en la planificación de radioterapia. Serna A, García-Cases F, Crespo A, Pena FJ, Redal MC, Martín T, Azinovic I, Cañón R, Brugarolas A. Congreso Conjunto de la Sociedad Española de Física Médica XVII y Protección Radiológica XII, Póster 212-15, junio de 2009.

2. Contribution of microarrays of gene expression (MAGE) to the definition of PET/CT as a qualified biomarker of early response in metastatic patients. Manuel Sureda, Aurora Crespo-Jara, Ramon Gonzalez Manzano, Maria del Carmen Redal, Francisco Javier Garcia-Cases, Elena M^a Martínez Navarro, Antonio Brugarolas; Plataforma de Oncología, Hospital Quironsalud Torrevieja. Cátedra Oncología Multidisciplinar-UCAM, Torrevieja, Spain. ASCO Abstract number for publication: 11573. 2017 ASCO Annual Meeting (June 2-6, 2017).

3. A pilot study of personalized determination of treatment by microarrays of genetic expression in patients with metastatic breast carcinoma. Manuel Sureda, Joseba Rebollo, Elena M^a Martínez, Francisco J. Fernández-Morejón, José Farré, Vicente Muñoz, Pedro Bretcha-Boix, Maritza Duarte, Ramón G. Manzano, Aurora Crespo, María del Carmen Redal, Belén Valenzuela, Antonio Brugarolas. *The Oncologist*. Considering for publication.