

Universidad Aut3noma de Barcelona



Departamento de Medicina

**DETECCI3N DE HIPERMETILACI3N ABERRANTE DE *CHFR*
EN SUERO Y SU INFLUENCIA EN LA SUPERVIVENCIA DE
PACIENTES CON C3NCER DE PULM3N NO MICROC3TICO
AVANZADO**

**Tesis presentada por Mar3a Fernanda Salazar Zaffaroni para optar al t3tulo de
Doctora en Medicina**

Dirigida por el Doctor Rafael Rosell Costa

Rafael Rosell Costa Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Germans Trías i Pujol de Badalona, certifica que la tesis titulada:

“DETECCIÓN DE HIPERMETILACIÓN ABERRANTE DE *CHFR* EN SUERO Y SU INFLUENCIA EN LA SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO”

ha sido realizada por María Fernanda Salazar Zaffaroni bajo su dirección y es apta para ser defendida ante el tribunal para optar al grado de Doctor

Dr. Rafael Rosell Costa
Director

Badalona, 4 de diciembre de 2008

A mi familia,

que siempre me apoyó aunque les doliera que me alejase

A mi país,

en el que me formé

A Dios,

por mostrarme cada día lo perfecto de su creación

*El valor, la buena conducta y la perseverancia
conquistan todas las cosas y obstáculos
que quieran destruirlas y se interpongan en su camino.”*

Ralph Emerson

Agradecimientos...

En primer lugar debo agradecer a los pacientes, sin cuya participación sería imposible llevar a cabo estas investigaciones.

Al Doctor Rafael Rosell Costa, director de esta tesis doctoral, quien al abrir las puertas de su servicio contribuyó a mi formación profesional en el mundo de la Oncología. Por su permanente ayuda y buena predisposición, por su continuo apoyo y confianza en todo momento durante estos 4 años.

Al Doctor Miquel Tarón Roca, por trasmitirme su interés y conocimientos en el área de la Biología Molecular y brindarme su apoyo cada vez que fue necesario.

A todos mis compañeros del laboratorio. En especial a mis compañeros de metilación: a José Luis Ramírez Serrano, quien me trasmitió sin egoísmos sus conocimientos y contribuyó a mi formación en la epigenética del cáncer y a Mireia Berdiel, con quien he compartido malos y buenos momentos del día a día.

A la Doctora y amiga Anna Martínez Cardús, que con su paciencia y siempre buena predisposición me proporcionó los primeros conocimientos del mundo del cultivo celular.

Al Doctor Miguel Ángel Molina, que me apoyó en la realización de esta tesis y contribuyó en los ensayos celulares.

A la Doctora María Sanchez Ronco por el brillante procesamiento de los datos estadísticos.

A Lourdes Franquet, Renee O'Brate y Maite Porta, por su generoso y continuo apoyo.

A todos los miembros del Servicio de Oncología Médica y Enfermería

Al Doctor Eduardo Richardet, por haberme contactado con el servicio del Doctor Rafael Rosell Costa, sin cuyo vínculo no hubiera sido posible mi formación profesional en este servicio.

A mis entrañables compañeras de piso: Sole, que siempre estuvo presente en los buenos y los malos momentos y que con sus consejos y positividad me ayudo a sobrellevar la lejanía que me separa de mi tierra. Y Bea con quien compartí momentos inolvidables.

A mi familia que siempre me brindo su apoyo y confianza y me impulso a crecer profesionalmente.

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	GENERALIDADES DEL CÁNCER DE PULMÓN	3
1.1.1	Epidemiología	3
1.1.2	Factores de riesgo	5
1.1.3	Clasificación histológica	6
1.1.4	Evolución Natural	8
1.1.5	Manifestaciones Clínicas	8
1.1.6	Estadificación	9
1.1.7	Tratamiento	14
–	Cirugía:	14
–	Radioterapia:	14
–	Terapias combinadas	15
–	Terapias dirigidas:	18
1.2	ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CÁNCER DE PULMÓN	21
1.2.1	Activación de Oncogenes	21
1.2.2	Genes supresores tumorales	23
1.2.3	Activación de las telomerasas	27
1.2.4	Apoptosis	28
1.2.5	Angiogénesis	31
1.2.6	Invasión tisular y metástasis	34
1.3	IMPORTANCIA DEL ADN TUMORAL CIRCULANTE	38
1.3.1	Primeras investigaciones	38
1.3.2	Origen de los ácidos nucleicos circulantes	39
1.3.2	Cuantificación de los ácidos nucleicos circulantes	40
1.3.4	Detección de alteraciones genéticas tumorales en sangre periférica	44
–	Mutaciones en oncogenes	44
–	Análisis de microsatélite	47
–	Análisis de la hipermetilación de zonas promotoras de genes supresores de tumores y de reparación de ADN	51
1.3.5	Perspectivas en el análisis del ADN tumoral circulante	54
1.4	METILACIÓN DEL ADN Y SILENCIAMIENTO GÉNICO	55
1.4.1	Aspectos generales de la metilación	55
1.4.2	DNA metiltransferasas	56
1.4.3	Proteínas que intervienen en la metilación y la represión de la transcripción	57
1.4.4	¿Cómo se regula de la expresión génica a través de la metilación?	60
1.4.5	Metilación del ADN y carcinogénesis	61
1.4.6	Deacetilación de las histonas y carcinogénesis	65

Índice

1.4.7	Hipermetilación de microRNA.....	65
1.4.8	Análisis de la metilación del ADN.....	66
1.4.9	Aplicaciones clínicas.....	70
–	Detección y pronóstico.....	70
–	Respuesta al tratamiento.....	71
–	Reactivación de genes silenciados.....	71
1.5	HIPERMETILACIÓN DE <i>CHFR</i> (CHECKPOINT WITH FORK HEAD-ASSOCIATED AND RING FINGER DOMAIN).....	73
1.5.1	Control de mitosis.....	73
1.5.2	Agentes antimicrotúbulos y control del estrés mitótico.....	75
1.5.3	Caracterización y función biológica de <i>CHFR</i>	76
1.5.4	Regulación y localización de <i>CHFR</i> durante el ciclo celular.....	80
1.5.5	Inactivación de <i>CHFR</i> por hipermetilación aberrante y sensibilidad a antimicrotúbulos.....	81
–	Búsqueda de alteraciones genéticas en el gen de <i>CHFR</i>	81
–	Inactivación por hipermetilación aberrante de <i>CHFR</i> y su implicancia en el control del ciclo celular.....	82
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	85
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
3.1	ASPECTOS GENERALES.....	91
3.1.1	Aparatos.....	91
3.1.2	Pacientes.....	92
3.1.2.1	Criterios de inclusión.....	92
3.1.2.2	Aleatorización y tratamiento.....	93
3.1.3	Líneas celulares.....	94
3.2	ENSAYOS REALIZADOS EN PACIENTES.....	95
3.2.1	Detección de la hipermetilación de <i>CHFR</i> en ADN circulante.....	95
3.2.1.1	Material y reactivos de uso general empleados.....	95
3.2.1.2	Extracción y concentración de DNA de muestras de suero.....	95
3.2.1.3	Modificación con bisulfito.....	97
3.2.1.4	Análisis por Methylation-Specific PCR.....	98
3.2.1.5	Electroforesis de producto de PCR.....	102
3.3	ENSAYOS REALIZADOS EN LINEAS CELULARES.....	104
3.3.1	Estudio del estado de metilación de <i>CHFR</i> en líneas celulares de cáncer de pulmón.....	104
3.3.1.1	Materiales y reactivos de uso general.....	104
3.3.1.2	Condiciones de cultivo.....	104

Índice

3.3.1.3	Recuento celular	106
3.3.1.4	Extracción y cuantificación de ADN de líneas celulares de cáncer de pulmón	107
3.3.1.5	Modificación con bisulfito	109
3.3.1.6	Secuenciación de una región del promotor del gen de <i>CHFR</i>	109
3.3.1.6.1	Amplificación de una región del promotor del gen de <i>CHFR</i>	109
3.3.1.6.2	Purificación del producto de PCR.....	111
3.3.1.6.3	PCR de secuenciación.....	111
3.3.1.7	Análisis por Methylation-Specific PCR	113
3.3.2	Estudio de la expresión de proteína de <i>CHFR</i> en líneas celulares de cáncer de pulmón	113
3.3.2.4	Consideraciones generales de la técnica de Western blotting	113
3.3.2.2	Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford	114
3.3.2.3	Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida-SDS (SDS- Page)	115
3.3.2.4	Eletrotransferencia.....	115
3.3.2.5	Detección inmunológica con anticuerpos específicos.....	116
3.3.3	Sensibilidad a erlotinib solo y en combinación con cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón.....	118
3.3.3.1	Materiales y reactivos de uso general.....	118
3.3.3.2	Ensayos de sensibilidad celular a fármacos.....	118
3.3.3.2.1	Tratamiento individual con cisplatino e erlotinib	118
3.3.3.2.2	Recuento celular en placa	119
3.3.3.2.3	Análisis de citotoxicidad: determinación de sinergia, aditividad y antagonismo.....	120
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	122
4.	RESULTADOS	125
4.1	CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO GILT.....	127
4.2	OBJETIVO 1: “ESTUDIAR EL ESTADO DE METILACIÓN DE <i>CHFR</i> EN ADN TUMORAL CIRCULANTE DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO”	128
4.2.1	Análisis del estado de metilación de <i>CHFR</i> en suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado	128
4.2.2	Correlación entre las características clínicas de los pacientes y el estado de metilación de <i>CHFR</i>	129
4.2.3	Correlación entre el estado de metilación de <i>CHFR</i> y supervivencia, tiempo a la progresión y respuesta	130
4.2.3.1	Estado de metilación de <i>CHFR</i> y supervivencia	130

Índice

4.2.3.2	Estado de metilación de <i>CHFR</i> y tiempo a la progresión.....	131
4.2.3.3	Estado de metilación de <i>CHFR</i> y respuesta al tratamiento	133
4.2.3.4	Estado de metilación y supervivencia en respondedores	135
4.2.4	Subgrupo de pacientes que se beneficiarían de una quimioterapia individualizada	136
4.3	OBJETIVO 2: “ESTUDIAR LA INFLUENCIA DE SEGUNDAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO”	139
4.3.1	Análisis de las características clínicas y moleculares de los pacientes según hayan recibido o no segunda línea de tratamiento.....	139
4.3.2	Importancia del tratamiento en segunda línea en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.....	142
4.3.3	Supervivencia de los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento de acuerdo a las características clínicas y moleculares	143
4.3.4	Identificación de factores pronóstico para la supervivencia en pacientes tratados en segunda línea.....	145
4.4	OBJETIVO 3: “EXAMINAR EN UN MODELO DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN EL EFECTO DEL TRATAMIENTO SECUENCIAL CON CISPLATINO Y ERLOTINIB”	149
4.4.1	Análisis del estado de metilación de <i>CHFR</i> en líneas celulares.....	149
4.4.2	Expresión de proteína de <i>CHFR</i> y <i>EGFR</i> en líneas celulares de cáncer de pulmón.....	150
4.4.3	Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinoib y correlación con los niveles de expresión de <i>CHFR</i> y <i>EGFR</i>	152
5.	DISCUSIÓN	155
6.	CONCLUSIONES	167
7.	BIBLIOGRAFÍA	171

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
APC: Adenomatosis Polyposis Coli
ARN: Acido Ribonucleico
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP: Adenosin Tri-Phosphate o Adenosín Tri-Fosfato
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein
bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor o Factor de Crecimiento básico de Fibroblasto
BRCA 1: Breast Cancer 1
BS-MS-PCR: Bisulphite Sequencing Methylation PCR
BUBR: Budding Uninhibited by Benzimidazoles
CAM: Cell Adhesion Molecules o Moléculas de Adhesión Celular
CHFR: Checkpoint with Forkhead and Ring Finger Domain
COBRA: Combined Bisulfite Restriction Assay
CPCNP: Cáncer de Pulmón de Célula No Pequeña
CPCP: Cáncer de Pulmón de Célula Pequeña
CPM: Cáncer de Pulmón Microcítico
CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico
CR: Cistein Region
DAPK-1: Death-Associated Protein Kinase 1
DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida de Alta Resolución Desnaturalizante
DMSO: Di Methyl Sulfoxide o Di Metil Sulfóxido
DNMT: DNA Metil Transferase o ADN Metil Transferasas
EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid o Ácido Diamino Tretacético
EGF: Epidermal Growth Factor o Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor o Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico
EGFR TKIs: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors o Inhibidores de la Torosina Quinasa del Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico
ER: Strogenic Receptor o Recepter Estrogénico
ERCC1: Excision Repair Cross-Complementing Repair -1 gene
FBS: Fetal Bovine Serum o Suero Fetal Bovino
FHA: Fork-Head Associated domain
FHIT: Fragile Histidine Triad
GADD45: Growth Arrest and DNA Damage
GSTP1: Glutathione S-transferase pi
H: Histone o Histona
HAT: Histone Acil Transferase Histona Acil Transferasa

Abreviaturas

HDAC: Histone Deacetilase o Histona Deacetilasa
hMLH1: human MutL Homolog 1
HPCE: High-Performance Capillary Electrophoresis o Cromatografía Capilar de Alta Resolución
HPLC: High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida de Alta Resolución
hTERT: human Telomerase Reverse Transcriptase
IGF: Insulin Growth Factor o Factor de Crecimiento Insulínico
IL: Interleuquin o Interleuquina
LINES: Long Interspersed Nuclear Elements
MAD: Mitotic Arrest Deficient
MBD: Metil Binding Protein
MDM2: Double Minute
MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyl Transferase
MS- SnuPE: Methylation Sensitive Single Nucleotide Primer Extension
MS-PCR: Methylation specific PCR
NF κ B: Nuclear Factor κ B O Factor Nuclear κ B
PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina
PCR: Polimerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF: Platelet Derived Growth Factor o Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor o Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PET: Positron Emission Tomography o Tomografía de Emisión de Positrones
PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase o Fosfoinositol 3-quinasa
PLAU: Plasminogen Activator Urokinase o Uroquinasa Activador del Plasminógeno
Plk1: Polo Like Kinase
PML: Promyelocytic Leukemia Protein Proteína Promielocítica de Leucemia
PTTG1: Pituitary Tumor-Transforming 1 Protein
Q-MS-PCR: Quantitative-RealTime-PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real
RAR- β : Retinoic Acid Receptor- β o Receptor de Ácido Retinoico- β
RASSF1: Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family 1
RB: Retinoblastoma Protein o Proteína de Retinoblastoma
RF: Ring Finger Domain
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa de Retrotranscripción

Abreviaturas

RIE: Radio Inmuno Ensayo

SAC: Mitotic Assenbly Checkpoint

SEMA3F: Semaphorin 3F,

SSCP: Denaturing High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida
Desnaturalizante de Alta Definición

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TAMs: Tumor Associated Macrophages

TCTP: Translationally Controlled Tumour Protein

TGF: Tumoral Growth Factor o Factor de Crecimiento Tumoral

TNF: Necrosis Growth Factor o Factor de Necrosis Tumoral

TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis

VATS: Video-Assisted Thoracoscopic Surgery O Cirugía Torácico Video Asistida

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor o Factor de Crecimiento del Endotelio
Vascular

VHL: Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER DE PULMÓN

1.1.1 Epidemiología

– Incidencia

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias con mayor incidencia a nivel mundial. Cada año se diagnostican más de un millón de nuevos casos en todo el mundo. Las mayores incidencias se encuentran en Europa del Este y del Sur y en Estados Unidos [1]

En España la incidencia es de 55,8 casos por 100.000 habitantes y año. Si bien es una incidencia elevada, desde mediados de los años 90 tiende a estabilizarse e incluso a descender desde el año 2000. En el sexo femenino la incidencia es de las más bajas del mundo 5,4 casos por 100.000 habitantes; aunque desde los años 90 aumenta considerablemente a un ritmo del 2,4% anual, debido a que las mujeres comenzaron a fumar recién a fines de la década del 80 [2-4]

– Mortalidad

El cáncer de pulmón fue la causa de aproximadamente 1.200.000 muertes en todo el mundo en el año 2002. Es la primera causa de muerte por cáncer entre los hombres y la segunda entre las mujeres, después del cáncer de mama. Si bien se ha visto una disminución de los índices de mortalidad en los hombres en la mayoría de los países, la mortalidad en la población femenina ya supera a la de cáncer de mama en países como Estados Unidos, el Reino Unido, Canadá y Dinamarca [4, 5]

En España mueren unas 18.000 personas al año; unos 16.000 hombres y unas 2.000 mujeres. Aunque en la población masculina mortalidad es elevada, así como sucede con la incidencia, tiende a estabilizarse desde los años 90. En la población femenina está aumentando. Entre los años 1990-2000 sufrió un aumento de 30,5% y se estima que continuará aumentando [2, 4]

Introducción

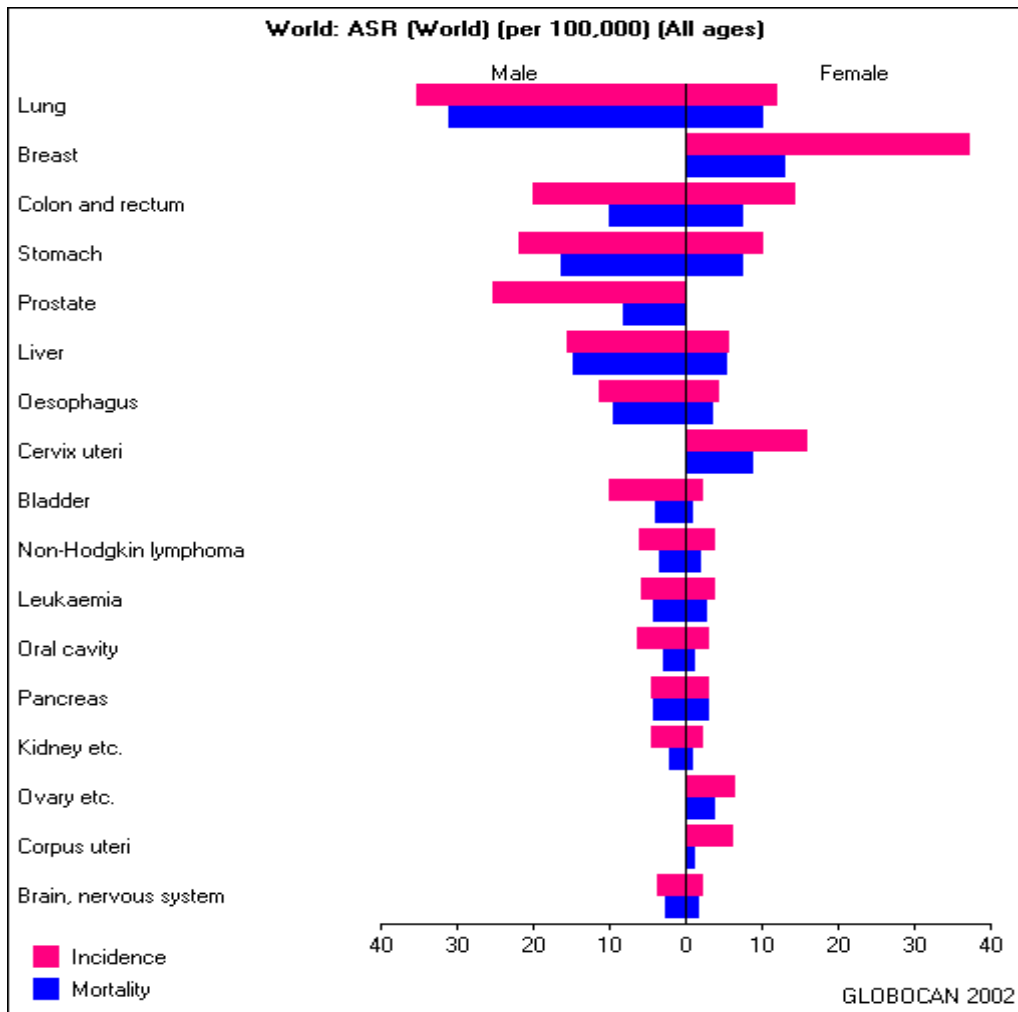


Figura 1: Incidencia y mortalidad de los distintos tipos tumorales a nivel mundial

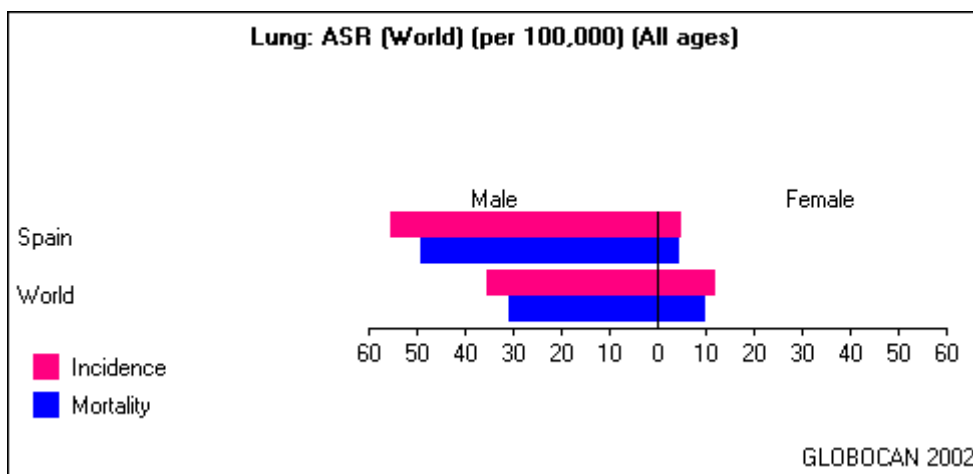


Figura 2: Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón por sexo en España y el Mundo

1.1.2 Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón podemos encontrar los siguientes:

– **Tabaco:** resulta evidente que existe una relación estrecha entre el hábito de fumar y el riesgo de padecer cáncer de pulmón. El riesgo se incrementa con el número de cigarrillos fumados, los años de duración del hábito, la edad de comienzo, el uso de cigarrillos sin filtros, el contenido de alquitrán y distintos aditivos añadidos para que la nicotina resulte más agradable. Más de 20 sustancias químicas han sido reconocidas como causantes de tumores en animales de laboratorio y seres humanos, de éstas los hidrocarburos aromáticos y las nitrosaminas desempeñan importantes funciones [6]. Estos carcinógenos desencadenan mutaciones en genes muy importantes para mantener la estabilidad celular y permitir su desarrollo, como los genes supresores de tumor y aquellos asociados a la reparación de ADN [7]. Los efectos nocivos del tabaco se trasladan también a los fumadores pasivos, en los cuales el riesgo de padecer cáncer de pulmón se incrementa hasta un 25-30% [8]

– **Predisposición genética:** sólo el 20% de los fumadores desarrollan cáncer de pulmón, por lo que es evidente que existe una predisposición genética relacionada con este proceso. Existen varios estudios llevados a cabo en los que se trata de asociar el cáncer de pulmón con la historia familiar del mismo [9]. También se ha encontrado asociación entre la mayor incidencia de padecer cáncer de pulmón y la presencia de ciertos polimorfismos en las enzimas involucradas en la detoxificación y metabolismo del tabaco [10]

– **Sexo:** si bien no se tienen evidencias claras, las mujeres podrían tener una mayor susceptibilidad a padecer el cáncer de pulmón. Las mujeres tienen una mayor incidencia de cáncer de pulmón de célula pequeña y de cáncer de pulmón de célula no pequeña del tipo adenocarcinoma [11]. Este hecho podría relacionarse con una mayor susceptibilidad a los carcinógenos, dentro de ellos al tabaco; así como también a los estrógenos hormonales, ya que se ha comprobado la existencia de receptores estrogénicos a nivel intracelular y de la superficie de las células tumorales [12].

– **Ambiente:** agentes químicos a los que se puede estar expuesto por razones laborales como asbesto, fibras de sílice, compuestos orgánicos como el éter metílico y otros compuestos aromáticos, los gases de la polución, metales como el cromo, el níquel y el arsénico y la radiación ionizante favorecen también el desarrollo del cáncer de pulmón [13].

– **Dieta:** la información que se tiene sobre la implicación de la misma es un poco controvertida. Aunque muchos de los pacientes que presentan cáncer de pulmón toman menos frutas, vegetales y nutrientes relacionados como el β -caroteno; no se obtuvieron resultados significativos al suplementar la dieta de pacientes con riesgo a desarrollar cáncer de pulmón [14]. Algo similar ocurre con los niveles de ácido fólico, relacionados con una menor capacidad reparadora y por tanto con una mayor susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón [15]. Otros autores afirman que el agregado de agentes antioxidantes como la vitamina C y E y oligoelementos como el selenio ayudarían a eliminar los radicales libres originados en nuestro organismo, evitando que se produzcan daños en el ADN [16].

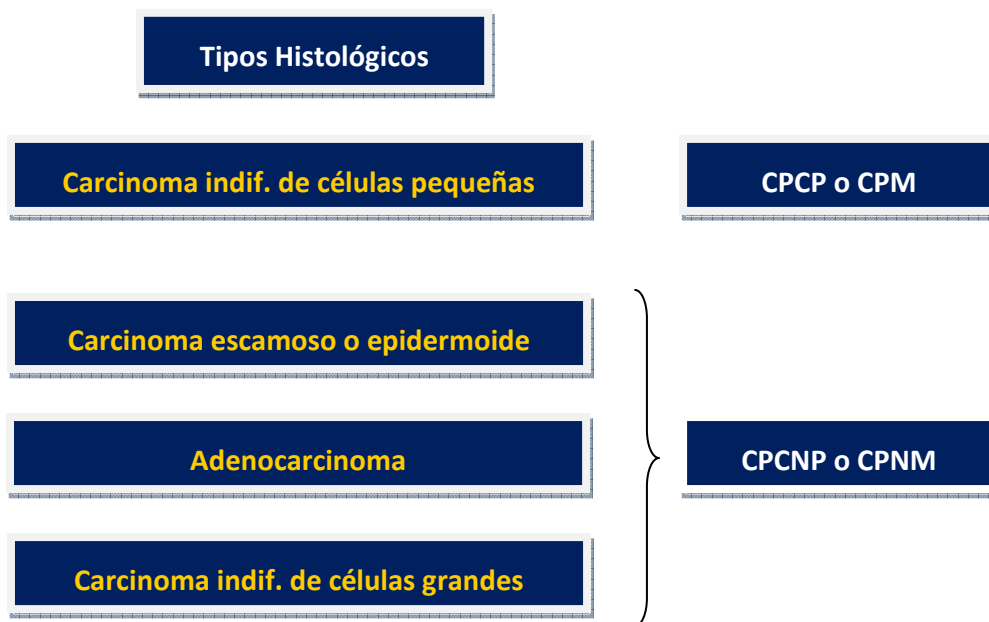
1.1.3 Clasificación histológica

El cáncer de pulmón puede clasificarse en función de las características de sus células en dos grandes grupos:

– **cáncer de pulmón de célula pequeña o microcítico (CPCP o CPM)**, con características biológicas propias.

– **cáncer de pulmón de célula no pequeña o no microcítico (CPCNP o CPNM)**, dentro del cual se agrupan tres patrones histológicos bien diferenciados. **Carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma indiferenciado de células grandes.** Este grupo comprende entre el 70- 80 % de todos los cáncer de pulmón [17].

El tipo histológico más frecuente entre los hombres es el carcinoma escamoso, mientras que en las mujeres es el adenocarcinoma, reflejando la diferencia en el mecanismo involucrado en la carcinogénesis en ambos sexos [18].



En el presente trabajo haremos referencia al cáncer de pulmón de células no pequeña o no microcítico (CPCNP o CPNM):

– **Carcinoma escamoso o epidermoide:** supone el 30% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico. Se presenta en la periferia pulmonar como un pequeño nódulo subpleural. En los estadios iniciales envuelve a las células mucosas, sin invasión de la membrana basal, teniendo un pronóstico similar al de un adenocarcinoma periférico. En los estadios más avanzados, éste comienza a invadir el parénquima y el lumen bronquial, produciendo obstrucción, con la consiguiente atelectasis y neumonía. Histológicamente se compone de células con un alto grado de queratinización. Tienden a tener un lento crecimiento [17].

– **Adenocarcinoma:** abarca el 40% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico. Se localiza en la periferia y en las vías aéreas pequeñas. El precursor de esta patología es la hiperplasia atípica alveolar (AAH). Son lesiones de aproximadamente 5 mm de diámetro que se componen de neumocitos tipo II que proliferan en la pared alveolar, la cual puede presentarse normal o con un mayor crecimiento de fibras. Estas lesiones iniciales resultan muy difíciles de diferenciar, ya que están constituidas por células pequeñas que presentan una zona nuclear atípica en comparación con las grandes lesiones de estadios más avanzados en las que el grado de progresión de las células anormales es más evidente [17].

– **Carcinoma indiferenciado de células grandes:** se corresponde al 10% de todos los casos de cáncer de pulmón no microcítico. Lo constituyen células grandes sin diferenciación citoplasmática. El pronóstico es similar al de un adenocarcinoma. Puede presentar un componente neuroendócrino reconocido por las características histológicas, la inmunohistoquímica o la determinación ultra estructural de estos gránulos. Cuando se acompaña de necrosis y un alto índice de mitosis, se asocian a mal pronóstico [17]

1.1.4 Evolución Natural

Después de un período variable de crecimiento dentro del parénquima pulmonar o de la pared bronquial, el tumor primario invade los canales vasculares y linfáticos, metastatizando los nódulos linfáticos regionales y posteriormente sitios más distales [17].

El tumor primario puede invadir estructuras tales como la pleura del mediastino, los grandes vasos, el corazón, el esófago, el diafragma, o la pared contigua al pecho. Una vez que se observa la invasión vascular o linfática, la metástasis a sitios distales es común. Los órganos más comúnmente afectados son el hueso, el hígado, las glándulas suprarrenales y el cerebro. Las metástasis dentro del pulmón son el resultado de una variedad de mecanismos, incluyendo la embolización endobronquial y la diseminación linfática y hemática retrógrada [17].

1.1.5 Manifestaciones Clínicas

Éstas varían según las características histológicas del tumor y el grado de invasión loco regional, así como la localización, el tamaño y el número de metástasis distales. En algunos casos se diagnostica accidentalmente a través de una radiografía de tórax de un paciente asintomático. Sin embargo, éste no es el hallazgo más frecuente, ya que la mayoría los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados en los que se presentan variados signos y síntomas. Dentro de los más comunes podemos citar: tos, hemoptisis, dificultades para respirar, neumonitis por obstrucción, dolor pleural, pérdida el apetito y adelgazamiento sin causa aparente [19].

Introducción

Resulta crucial un diagnóstico y estadificación preciso ya que de éste dependerán los criterios terapéuticos y el pronóstico general del paciente. Es importante atender el historial general incluyendo, sus hábitos tabaquitos, ocupaciones y la historia familiar, centrarse en la aparición de nuevos síntomas, considerando también aquellos relacionados con la enfermedad metastásica

Es necesario llevar a cabo un estudio histológico en aquellos pacientes con sospechas de cáncer de pulmón. La citología de esputo es una técnica no invasiva que permite la identificación de tumores de localización central, aunque con una baja sensibilidad, por lo que un resultado negativo requiere de otra prueba complementaria. La broncoscopia es la técnica de elección en tumores endobronquiales, con una sensibilidad de casi un 90%, sin embargo resulta menos concluyente para tumores periféricos o de menos de 2 cm de diámetro. En pacientes con tumores periféricos la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) tiene un rendimiento de casi un 90%. La toracotomía raramente se emplea con fines diagnósticos [20].

Cabe realizar una radiografía de tórax y una tomografía axial computarizada (TAC) que permitan ver el grado de extensión de la enfermedad. También ha adquirido vital importancia para ayudar a la estadificación y al seguimiento de la enfermedad la utilización de la tomografía por emisión de positrones (PET). Los primeros trabajos publicados sobre el empleo de la PET en el cáncer de pulmón datan de 1990, cuando se utilizó como método de diagnóstico diferencial [21]. Posteriormente múltiples estudios mencionan su utilidad en la estadificación del cáncer de pulmón al comparar los resultados obtenidos frente a la TAC [22].

1.1.6 Estadificación

En 1946 *Denoix* propuso un sistema de clasificación de tumores de acuerdo a las características de Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM). Años más tarde este sistema fue aprobado para la clasificación del estadio clínico y patológico de tumores malignos [23] Este sistema ha sido modificado por *Mountain* en 1986 y 1997, para la estadificación de cáncer de pulmón con el objetivo de identificar grupos con modalidades terapéuticas afines y pronósticos similares (Tabla 1 y Tabla 2). Se establecieron 4 estadios para cáncer de pulmón con diferencias significativas en la supervivencia (Tabla 3) [24].

Introducción

La última publicación en el año 2002 de esta clasificación no presenta diferencias con respecto a la anterior para cáncer de pulmón. En 2007, la Internacional Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) ha publicado una propuesta para la revisión de los descriptores T en la próxima edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón. Se analizaron los datos de más de 18.000 pacientes y se calculó la supervivencia para T1, T2, T3 y T4NOMO resecaados por completo (R0) y para cada descriptor de T. En resumen, los expertos recomiendan dividir T1 en T1a y T1b, T2 en T2a y T2b, y reclasificar T2c y los ganglios adicionales en el mismo lóbulo como T3, los ganglios en el lóbulo no primario ipsilateral como T4 y los derrames pleurales o pericárdicos malignos como M1. Dichos cambios se incluirían en la próxima edición del año 2009 [25].

Introducción

<i>Tumor primario</i>	
TX	Tumor primario que no puede ser demostrado o tumor demostrado por la presencia de células malignas positivas, pero no visibles radiológica o broncoscópicamente.
T0	No hay evidencia de tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm de diámetro como máximo, rodeado de pulmón o de pleura visceral, sin invasión del bronquio principal.
T2	Tumor de $>$ de 3 cm de diámetro que invade la pleura visceral, o produce atelectasia o neumonitis hasta el hilio sin afectar a todo el pulmón, o que el invade el bronquio principal hasta una distancia mayor o igual a 2 cm de la carina central.
T3	Tumor de cualquier tamaño que invade directamente la pared torácica, o el diafragma o la pleura mediastínica, o el pericardio parietal o el bronquio principal a una distancia menor de 2 cm de la carina traqueal sin afectarla, o produce atelectasia o neumonitis obstructiva en todo el pulmón.
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade mediastino, o corazón, o grandes vasos, o carina traqueal, o tráquea, o esófago o cuerpo vertebral o que se acompaña de nódulos pulmonares metastáticos en el mismo lóbulo, o produce derrame pleural maligno.
<i>Afectación ganglionar regional</i>	
Nx	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.
N0	No hay afectación ganglionar.
N1	Afectación de los ganglios peribronquiales y/o bronquiales ipsilaterales incluida la invasión directa por tumor.
N2	Afectación de los ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
N3	Afectación de los ganglios mediastínicos y/o hiliares contralaterales y/o de los ganglios escalénicos y/o supraclaviculares homo y/o contralaterales.
<i>Afectación metastásica</i>	
Mx	No pueden ser evaluadas.
M0	No hay metástasis.
M1	Presencia de metástasis.

Tabla 1: Sistema de clasificación del estadio tumoral TMN para cáncer de pulmón [24]

Introducción

<i>Estadio</i>	<i>TNM</i>
0	Carcinoma in situ
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
IIB	T2N0M0
IIA	T1N1M0
IIB	T2N1M0
	T3N0M0
IIIA	T3N1M0
	T1N2M0
	T2N2M0
	T3N2M0
IIIB	T4N0M0
	T4N1M0
	T4N2M0
	T1N3M0
	T3N3M0
	T4N3M0
IV	Cualquier T/Cualquier N/M1

Tabla 2: Estadios según la clasificación TNM para cáncer de pulmón [24]

Introducción

<i>Estadio Clínico</i>	Supervivencia (% acumulativo)				
	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
<i>IA</i>	91	79	71	67	61
<i>IB</i>	72	54	46	41	38
<i>IIA</i>	79	49	38	34	34
<i>IIB</i>	59	41	33	26	24
<i>IIIA</i>	50	25	18	14	13
<i>IIIB</i>	34	13	7	6	5
<i>IV</i>	19	6	2	2	1

Tabla 3: Supervivencia según el estadio en el cáncer de pulmón [24]

1.1.7 Tratamiento

La cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son los tres tratamientos básicos para el cáncer de pulmón, que pueden aplicarse solos o en forma conjunta dependiendo del estadio en que se encuentra el paciente [26].

– **Cirugía:** es el tratamiento de elección en los pacientes con enfermedad limitada. Generalmente en los estadios tempranos (I – II), cuando el tumor no se ha extendido mas allá de los ganglios linfáticos regionales, se logra realizar una escisión completa [26].

El tipo de procedimiento quirúrgico a realizar depende del grado de extensión de la enfermedad y del estado cardiopulmonar del paciente. Si bien la *neumonectomía* era inicialmente la cirugía de elección; la *lobectomía* permite una extracción completa cuando la masa tumoral se encuentra más localizada. Actualmente, las *resecciones de áreas de más pequeñas* afectadas son preferibles cuando son anatómicamente posibles y aseguran una completa extracción de la masa tumoral [26].

La cirugía *torácico video asistida* (VATS) consiste en una intervención poco invasiva [27]. Presenta ventajas considerables al compararla con la toracotomía convencional. Requiere una breve hospitalización, se asocia a baja morbilidad y mortalidad postoperatoria, mínimo riesgo de hemorragia intraoperatoria, y mínima recurrencia loco regional [26]. En pacientes estadio I se obtuvieron iguales resultados en supervivencia y recurrencia comparada con los procedimientos quirúrgicos utilizados hasta el momento [28].

– **Radioterapia:** se emplea en pacientes de estadio temprano no operables para reducir el tamaño tumoral, así como en estadios localmente avanzados no operables y en estadios IV como tratamiento paliativo [26].

Se puede emplear la *braquiterapia*, con fines curativos o paliativos, o la *radioterapia de haz externo con un acelerador lineal*. En la actualidad también existen técnicas más modernas como la *radioterapia conformada en tres dimensiones* (3D

CRT) y la *radioterapia de intensidad modulada* (IMRT), que al definir mejor el área tumoral causan menores efectos adversos [17]. Un estudio reciente demuestra que la *radioterapia estereotorácica* puede ser una buena alternativa para el tratamiento de pacientes que no toleran un procedimiento quirúrgico. Mediante el mismo la supervivencia a dos años es similar a la de los pacientes sometidos a cirugía [29].

– **Quimioterapia:** Sólo un pequeño porcentaje de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico logra sobreponerse a esta enfermedad. Este pobre resultado no es debido al fracaso de la cirugía o la radioterapia, sino a la presencia de micrometástasis en el momento del diagnóstico. Por todo ello, resulta primordial una terapia sistémica para limitar la enfermedad regional y para aquellos pacientes que presentan enfermedad metastásica [17].

Pese al avance por encontrar nuevos agentes quimioterápicos, el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado resulta poco satisfactorio. Estos pacientes obtienen máximo beneficio de la quimioterapia con agentes platinados. Estos pueden combinarse con drogas como taxanos (paclitaxel, docetaxel), vinorelbina, análogos de la camptotecina (irinotecan, topotecan) y gemcitabina. Con las combinaciones de estas drogas se obtienen tasas de supervivencia 30% a 40% superiores que su empleo como monoterapia. Sin embargo, estudios en fase III demostraron que las distintas combinaciones de agentes platinados presentan tasas de respuesta y supervivencia semejantes [30-34].

– **Terapias combinadas:** a modo de resumen sabemos que, la cirugía en los estadios tempranos asegura una mayor supervivencia en pacientes con CPNM. En pacientes con escisiones completas, la quimioterapia adyuvante ha demostrado mejorar la supervivencia [35, 36]. Del mismo modo la quimioradioterapia concurrente mostró ser superior que la secuencial en pacientes con estadio III [37]. En pacientes en estadios avanzados (IIIB con derrame pleural o IV) la quimioterapia basada en dobletes platinados ha mostrado beneficios [38]. Estudios fase III han demostrado que las distintas combinaciones de dobletes platinados presentan similares tasas de respuesta y supervivencia [31].

Quimioterapia adyuvante: Antes del 2003 había poca evidencia sobre el empleo de la quimioterapia adyuvante. Varios estudios se llevaron a cabo con el fin de confirmar su eficacia en pacientes resecables.

El *International Adjuvant Lung Trial* (IALT) demostró mejores resultados en supervivencia en pacientes completamente resecados tratados con quimioterapia adyuvante con agentes platinados que en brazo control. De los 1867 pacientes resecados incluidos en el estudio, aquellos del brazo de tratamiento con quimioterapia (dobletes con agentes platinados) presentaron mejor supervivencia (44,5% vs 40,4%) y mayor supervivencia libre de enfermedad (39,4% vs. 34,3%) [35].

En el *NCIC CTG JBR. 10* y el *ANITA* se comparó la eficacia de la quimioterapia adyuvante con vinorelbina y cisplatino en estadios tempranos. En el primer estudio, los pacientes completamente resecados estadio IB (T2, N0) y II (T1, N1 o T2, N1) que recibieron quimioterapia adyuvante mostraron una supervivencia significativamente mayor que los pacientes del brazo control (94 meses vs. 73 meses). Para los pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante la tasa de supervivencia a los 5 años fue de 69% vs. 54% para aquellos pacientes incluidos en el brazo control [39]. En el estudio *ANITA*, que incluía pacientes estadio IB, II y IIIA, la mediana de supervivencia para los pacientes tratados con vinorelbina/cisplatino fue de 65,7 meses comparada con 43,7 meses en el grupo de pacientes en observación. La quimioterapia adyuvante demostró ser más efectiva en pacientes completamente resecados estadio II y IIIA, aunque no se observó ningún beneficio para los pacientes con estadio IB[36].

En el *CALGB 9633* se intentó demostrar la eficacia de la quimioterapia adyuvante con paclitaxel/carboplatino en pacientes con estadio IB (T2, N0, M0) [40]. Los últimos informes de este estudio demuestran que no hubo diferencias significativas en supervivencia entre los dos grupos (tratados con quimioterapia adyuvante y en observación) [41].

Basados en los datos obtenidos de estos estudios, el empleo de quimioterapia adyuvante se ha convertido en la mejor opción de tratamiento para pacientes en estadios II – III completamente resecados.

Quimioterapia Neoadyuvante: Diversos ensayos clínicos han demostrado la utilidad de la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con estadio IIIA N2 resecables.

El Grupo Español de Cáncer de Pulmón (*GECP*) presentó un estudio en el que los pacientes estadios IIIA N2 que recibieron quimioterapia neoadyuvante (tres ciclos de mitomicina C, isofosfamida y cisplatino) seguida de cirugía presentaron una mediana de supervivencia de 26 meses y una tasa de supervivencia a tres años de 30% comparados con aquellos pacientes sometidos a cirugía en el que la supervivencia fue de tan sólo 8 meses con una tasa de supervivencia a los tres años de 0% [42]. En otro estudio, se empleó de docetaxel como única terapia neoadyuvante en pacientes IIIA y IIIB que con posterioridad se sometieron a cirugía. Sin embargo no hubo diferencias significativas en supervivencia entre el grupo control y el experimental [43].

También se evaluó la eficacia de la quimioterapia neoadyuvante utilizando quimioterápicos de tercera generación. En diversos centros se emplearon distintas combinaciones en pacientes IIIA N2 y aquellos pacientes que respondían a la quimioterapia eran sometidos a cirugía. En líneas generales, la tasa de respuesta de estos pacientes oscilaba entre el 56 - 70%, con una mediana de supervivencia de entre 16 a 28 meses [44-46]. En el estudio llevado a cabo por el Swiss Group for Clinical Cancer Research, los pacientes con una sobrevaluación del estadio nodal y aquellos con resección completa mostraron mayores tasas de supervivencia [44, 45].

Debido a que el empleo de la quimioterapia neoadyuvante se ha convertido en el estándar de tratamiento en pacientes con estadio IIIA N2 resecables, más recientemente también se han llevado a cabo estudios en pacientes con estadios IB- II con el fin de estudiar su eficacia. En estos estudios, la administración de quimioterapia preoperatoria en estadios tempranos incrementa la respuesta, con una tasa de toxicidad aceptable.

El Grupo Español de Cáncer de Pulmón comenzó en el año 2000 un estudio en el que más de 500 pacientes con estadio I, II T3N1 son aleatorizados en tres ramas: cirugía, quimioterapia adyuvante y neoadyuvante; con el objetivo primario de comparar la supervivencia libre de enfermedad.

Quimioradioterapia: en pacientes en estadio IIIA o IIIB inoperables la administración de quimioradioterapia resulta ser más efectiva que la radioterapia sola. Más aún, estudios recientes demuestran que la quimioradioterapia concomitante es mucho más efectiva que la quimioradioterapia secuencial, aunque presenta mayor índice de toxicidad [37, 47].

En el estudio *SWOG (9504)* se evaluó la efectividad de la administración de quimioradioterapia concomitante y docetaxel como terapia de consolidación en pacientes no resecables con estadio III B de cáncer de pulmón de célula no pequeña [48]. La tasa de supervivencia a 5 años de estos pacientes fue de 29%, notablemente mayor a la obtenida en el estudio anterior, *SWOG (9019)*, en el que no se empleó docetaxel como terapia de consolidación. Además, la mediana de supervivencia se incrementó de 15 a 26 meses para los pacientes incluidos en el *SWOG (9504)* [49].

En pacientes estadio IIIA y IIIB no operables se evaluó la eficacia de emplear quimioterapia de inducción seguida de radioterapia o quimioradioterapia con paclitaxel. La respuesta, el tiempo a la progresión y la supervivencia fue significativamente mayor en el grupo de pacientes tratados con quimioradioterapia concomitante que en aquellos tratados solo con radioterapia [50].

– **Terapias dirigidas:** en los últimos años se han desarrollado terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de pulmón, que bloquean de manera específica diferentes mecanismos celulares que favorecen el crecimiento y la proliferación tumoral.

Vía de traducción de EGFR

EGFR es el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, con actividad tirosina quinasa, que regula la proliferación celular. Erlotinib inhibe la actividad tirosina quinasa de receptor del crecimiento epidérmico [51], su empleo en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado o metastáticos, que hayan recibido al menos una línea de quimioterapia previa fue aprobado en el 2004 por la Federal Drug Administration. Sin embargo, su utilización en pacientes no seleccionados se asocia a una baja tasa de respuesta [52]. Las mutaciones en la porción tirosina quinasa de dicho receptor, particularmente la delección del exón 19, se asocia a una mayor respuesta [53]. Éstas están presentes mayoritariamente en mujeres, jóvenes, no fumadoras, de raza asiática y con histología de adenocarcinoma.

Introducción

En un estudio prospectivo iniciado en abril de 2005 por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón se han incluido hasta la actualidad más de 2400 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado. El análisis de la presencia de mutaciones de *EGFR* en tejido tumoral permitió observar las mutaciones en el 15 % de los pacientes. Como primera línea de tratamiento se ha obtenido una tasa de respuesta del 90% en los pacientes que presentaron las mutaciones, independientemente de ECOG PS, de sitio de las metástasis y de la edad. El tiempo a la progresión para los pacientes con mutaciones de *EGFR* es de 9.6 meses[54].

En algunos pacientes con respuesta a los inhibidores tirosina quinasa se comenzaron a observar progresiones, relacionadas con algún mecanismo de resistencia a estos fármacos. Pao y cols, identificaron una segunda mutación en el exón 20 de pacientes que habían progresado tras el tratamiento con *EGFR* TKIs. Dicha mutación consiste en la substitución de una metionina por una treonina en la posición 790 del dominio tirosina quinasa [55]. También fue hallada en el 60% de los pacientes con prgogresión analizados en el estudio del Grupo Español de Cáncer de Pulmón [54].

Vía de transducción de VEGF

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) es indispensable para promover la angiogénesis y el mantenimiento de la vasculatura existente. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [56]. En 2006 se aprobó la utilización de Bevacizumab para el tratamiento de CPNM no escamoso en combinación con paclitaxel o carboplatino [56].

Vía de transducción de PI3K/AKT

La vía de transducción de PI3K/Akt se activa a través de diferentes receptores extracelulares como VEGFR, EGFR Y PDGFR. La activación de esta vía genera señales de proliferación celular, inhibición de la apoptosis, inducción de la motilidad celular y expresión de factores de crecimiento y angiogénesis. PI3K está sobreexpresada en diferentes procesos tumorales, desencadenado un incremento de esta vía de transducción. La posibilidad de inhibir PI3K en combinación con agentes

Introducción

quimioterápicos convencionales y otras terapias dirigidas podría resultar ser altamente efectivo en el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

En la actualidad se están desarrollando agentes que bloquean este mecanismo de transducción de señal. Algunos de estos fármacos bloquean el sitio de unión de ATP de manera irreversible, inhibiendo el crecimiento celular [57]. Sin embargo, debido a la existencia de varias isoformas de PI3K la eficacia y la tolerabilidad de los inhibidores dependerán del grado de especificidad que tengan hacia las distintas isoformas.

En la actualidad estudios moleculares han demostrado la importancia como factores pronósticos de numerosas alteraciones, como mutaciones, modificaciones epigenéticas y cambios en la expresión de proteínas. En muchos casos estas alteraciones todavía no se han validado. Su evaluación contribuirá al desarrollo y utilización de quimioterapias individualizadas con la finalidad de alcanzar una mejor supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

1.2 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CÁNCER DE PULMÓN

En el cáncer de pulmón, al igual que en todas las patologías malignas, se suceden un acúmulo de alteraciones en determinados genes. Esto da lugar a una pérdida de control en el mecanismo de crecimiento celular y conduce a la proliferación clonal de poblaciones anormales.

Las alteraciones involucradas en el desarrollo del fenotipo tumoral incluyen: la activación de protooncogenes u oncogenes dominantes, la activación oncogenes recesivos o genes supresores, la desregulación de los mecanismos apoptóticos y la pérdida del control de la telomerasas, favoreciendo la angiogénesis y la invasión tumoral

De allí la importancia del uso de la Biología Molecular basado en el estudio de dichos genes como polimorfismos, mutaciones, expresión e hipermetilación. La determinación de alteraciones genéticas puede tener aplicación clínica en el diagnóstico precoz de la enfermedad, la predicción de recidivas y como marcadores de tratamiento individualizado.

1.2.1 Activación de Oncogenes

Los oncogenes o protooncogenes codifican para proteínas que actúan como factores de crecimiento celular, receptores de los factores de crecimiento, proteínas transductoras y proteínas nucleares implicadas en la regulación transcripcional. La activación de estos genes se produce sólo con la alteración de uno de los alelos que codifican para dicho gen, ya sea por un proceso de translocación, amplificación o mutación puntual.

- a. Familia de ERBB:** es un grupo de receptores de transmembrana compuesto por cuatro miembros EGFR/ERBB1, ERBB2, ERBB3 y ERBB4. Todos ellos poseen un dominio extracelular de unión al ligando, una región de transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. Se expresan en diferentes tejidos. Su activación por la unión de ligandos de la familia de los factores de crecimiento (EGF), favorece su homo u heterodimerización y la fosforilación de residuos de tirosina en la porción

Introducción

intracelular, con la consiguiente activación de señales intracelulares (Figura 3). La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha correlacionado con una peor supervivencia en los enfermos con CPNM, e incluso con un incremento de la capacidad metastásica [58]. Más aún se ha descrito que las mismas células tumorales son capaces de expresar ligandos que incrementan la activación de EGFR, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento tumoral alfa (TGF α), conformando un bucle de estimulación autocrina [59]. Convirtiéndose en nuevas dianas terapéuticas. En el año 2004 se identificaron mutaciones en el dominio tirosina quinasa, que determinan una activación prolongada del receptor. Estas mutaciones confieren sensibilidad a agentes inhibidores del dominio tirosina quinasa [60-62]. Dichas mutaciones se circunscriben a no fumadores, adenocarcinomas, mujeres y principalmente asiáticas.

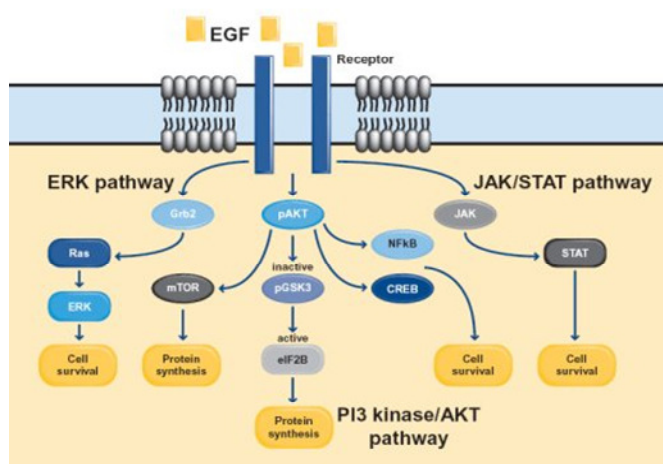


Figura 3: Vía de señalización de EGFR. La activación de EGFR desencadena la autofosforilación de los residuos tirosina de la porción intracelular, generando una activación en cascada de múltiples vías de transducción (Ras, AKT y JAK) que favorecen la supervivencia celular

A pesar de que se desconoce un ligando específico para ERBB2, se cree que dicho receptor actúa como co-receptor permitiendo la formación de heterodímeros. Elevados niveles de ERBB2 se asocian a resistencia e incremento de la capacidad metastásica, y consecuentemente a mal pronóstico en cáncer de pulmón no microcítico [63].

- b. Familia de Ras:** son proteínas citoplasmáticas que juegan un papel importante en las señales de transducción y proliferación celular. Se activan tras la unión de GTP (guanosina trifosfato) y en su posterior inactivación interviene una GTPasa intrínseca que hidroliza el GTP a GPD (guanosina difosfato).

De todos sus miembros, principalmente K-ras se activa por mutaciones puntuales. Estas mutaciones resultan en una inactivación de la actividad GTPasa y en una continua activación de esta vía de señalización. Las mutaciones ocurren principalmente en el codón 12, 13 y 61, pudiéndose detectar en el 30% de los adenocarcinomas, en el 23% de los carcinomas de células grandes y en el 8% de los carcinomas epidermoides. Mitsudomi fue el primero en asociar la presencia de estas mutaciones con un peor pronóstico en pacientes con CPNM avanzado [64]. Sin embargo, su papel como marcador pronóstico no está esclarecido [65-67].

- c. Familia de Myc:** son proteínas que regulan la expresión de gran número de genes. C-Myc se encuentra activado por un mecanismo de amplificación o regulación transcripcional que conduce a su sobreexpresión en aproximadamente entre el 8 -20% de los carcinomas no microcítico y en el 18-31% de los carcinomas microcítico [68]. Su amplificación es mayor en pacientes con cáncer de pulmón microcítico tratados con quimioterapia y correlaciona con una menor supervivencia [69]

1.2.2 Genes supresores tumorales

Codifican para proteínas que cuya función es inhibir la proliferación celular. Como los oncogenes, los genes supresores de tumores tienen funciones diversas en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular y la muerte celular programada. Su inactivación se desencadena por la pérdida consecutiva de ambos alelos. Uno de ellos puede perderse por una delección o traslocación y el otro por una mutación puntual o un cambio epigenético.

Introducción

- a. **p53:** Se localiza en el cromosoma 17p y codifica para una proteína reguladora de la transcripción, que preserva la integridad del genoma ante cualquier agresión. Regula la expresión de genes intracelulares (p21, MDM2, GADD45 y BAX) provocando un arresto en el G1 del ciclo celular para permitir la reparación del daño producido al ADN o conducir a la apoptosis. El oncogén MDM2 funciona como regulador negativo de esta vía de transducción, al inhibir la expresión de p53.

Es la alteración más frecuente en los cánceres humanos [70]. Mutaciones del gen p53 se observan en el 100% de las líneas celulares y en el 77% de los carcinomas microcítico, y en el 74% de las líneas celulares y el 49% de los carcinomas no microcítico. Se han identificado deleciones, reordenamientos y mutaciones que producen la pérdida completa del p53 o alteraciones en la proteína; la alteración más frecuente es la transversión G-T relacionado con los carcinógenos del tabaco[71, 72] .

Las mutaciones de p53 se asocian a mayor respuesta al tratamiento con agentes platinados y radioterapia. En muchos trabajos las mutaciones de p53 confieren peor pronóstico a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [73].

- b. **Vía de transducción de p16^{ink4a}/CKD-Ciclina D/ RB:** consiste en un mecanismo de regulación del ciclo celular que controla el paso de G1 a S del ciclo celular.

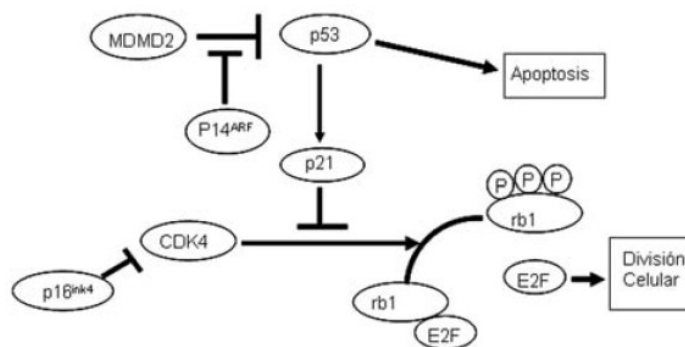


Figura 4: Rerepresentación esquemática de la vía de transducción de p16^{ink4a}/CKD-Ciclina D/ RB

Introducción

- **RB** constituye el núcleo de este mecanismo. En su estado desfosforilado se une al factor de transcripción E2F, inhibiendo la replicación de ADN. Su fosforilación permite la liberación de E2F favoreciendo el paso a S del ciclo celular. Las alteraciones en el gen de RB incluyen deleciones, mutaciones sin sentido o que alteran el splicing alternativo, generando proteínas anormales [74, 75]. Estas afectan a la mayoría de los casos de cáncer de pulmón microcítico y entre el 15-30% de los de cáncer de pulmón no microcítico [74].
- La fosforilación de RB está regulada por el complejo de quinasas dependiente de ciclinas (**CKD-Ciclina D**). La sobreexpresión de la ciclina D1 ocurre en el 25-50% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico y se asocia a de mal pronóstico y al hábito tabáquico. CDC4 también se encuentra sobre expresada en cáncer de pulmón no microcítico [76, 77].
- **p16**, también conocido como INK4a, inhibe la formación del complejo de ciclinas dependientes de quinasa al unirse a CDK4 y CDK6, impidiendo así la continuidad del ciclo celular. La pérdida de expresión de p16^{ink4a} es un evento común en cáncer de pulmón no microcítico y en lesiones pre-neoplásicas [78]. Variados mecanismos intervienen en este proceso; incluyen mutaciones, pérdidas de homocigotía y heterocigotía, e hipermetilación aberrante de la zona promotora del gen [79]. Debido a que la hipermetilación aberrante de p16^{ink4a} es un evento que coexiste con las mutaciones de p53 y a su elevada frecuencia en pacientes fumadores, podría ser empleada como un marcador biológico para identificar aquellos pacientes con elevado riesgo de padecer cáncer de pulmón [80]. Aunque en muchas ocasiones ninguno de estos mecanismos explican la falta de expresión de p16^{ink4a}. Trabajos recientes demuestran que su expresión también parece estar regulada por el oncogén BMI-1 [81].
- El gen que codifica para p16 permite obtener tres variantes proteicas por splicing alternativo. Una de ellas es una isoforma de la proteína inhibitoria conocida como p15 o INK4b. En algunos tumores las deleciones que afectan a p16^{ink4a} involucran también a p15^{ink4b}. Existe

Introducción

otra variable proteica p14^{ARF} que difiere en secuencia con p16^{ink4a}. Esta proteína actúa como un estabilizador de p53 al interactuar con MDM2, que regula negativamente a p53.

c. Cromosoma 3p: Se ha observado pérdida de heterocigosidad de esta región en más del 96% de los casos de cáncer de pulmón y el 78% de las lesiones pre-neoplásicas [82]. Muchos genes que funcionan como genes supresores de tumor se localizan en esta región.

– **FHIT:** (Fragile Histidine Triad) codifica para una proteína que actúa como una diadenosin trifosfato hidrolasa. La falta de expresión de dicha proteína por pérdida de heterocigosidad es muy frecuente en cáncer de pulmón y también en los estadios pre-neoplásicos [83, 84].

– **RASSF1:** codifica para una familia de proteínas cuya porción carboxilo terminal presenta alta homología con la proteína efectora de Ras, NORE-1 [85]. Se ha establecido su interacción con NORE1, provocando que la célula entre en apoptosis a través de la activación de la quinasa MST1. También interactúa con los microtúbulos y el complejo de CD20 en el control del ciclo celular [86].

El silenciamiento de RASSF1A a través de la hipermetilación aberrante de la zona promotora es un evento muy frecuente en el cáncer de pulmón microcítico (90%) y no menos importante en el cáncer de pulmón no microcítico (30-40%) [87-90]

– **RAR-β:** el receptor del ácido retinoico pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas. Este se localiza en las zonas citoplasmáticas y en compartimentos nucleares. Su activación desencadena señales que favorecen la morfología, crecimiento y la proliferación celular durante la embriogénesis

Su expresión se encuentra disminuida en entre el 40-60% de cáncer de pulmón no microcítico, debido a la hipermetilación de su zona promotora [91, 92]. Esta alteración epigenética también se observa en lesiones pre-neoplásicas [93].

- **SEMA3F:** forma parte de una familia de proteínas de secreción, de transmembrana y de asociación a la membrana que intervienen fundamentalmente en el proceso del desarrollo neuronal [94]. Recientemente se ha observado que actuaría vía p53 como un antagonista de VEGF durante el desarrollo tumoral, inhibiendo la angiogénesis y la proliferación celular [85, 95].

La pérdida de heterocigosidad de la región 3p21.3 en la cual se localiza SEMA3F resulta muy frecuente en diversos casos de cáncer [95]. La expresión de SEMA3F se encuentra disminuida por hipermetilación aberrante en cáncer de pulmón [96].

- d. **PTEN:** la proteína codificada por este gen supresor tumoral con actividad fosfodiesterasa inhibe la proliferación celular al inactivar la vía de PI3K/Akt. La pérdida de expresión de PTEN ocasiona un incremento de la vía de Akt, permitiendo la continuidad del ciclo celular y el consiguiente aumento de la proliferación celular.

La zona 10q, donde se encuentra ubicado el gen de PTEN, presenta una elevada frecuencia de pérdida de heterocigosidad en cáncer de pulmón. Sin bien las mutaciones en dicho gen se presentan en muy bajo porcentaje, no más del 16% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico, existen numerosos trabajos que demuestran la importancia de su baja expresión proteica en pacientes. La hipermetilación aberrante de la zona promotora de este gen podría ser la causa de esta alteración [97].

1.2.3 Activación de las telomerasas

La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico cuya actividad compensa la pérdida que ocurre en el proceso replicativo. La subunidad catalítica de dicho complejo es una transcriptasa reversa (hTERT) que emplea el ARN del complejo como molde para replicar la secuencia de ADN del telómero. La actividad de la misma es substancial en las células germinales y pluripotentes. En las células somáticas normales, las telomerasas permanecen inactivas y éstas continúan dividiéndose hasta que sus telómeros alcanzan una longitud crítica.

En células cancerosas la expresión de la telomerasa se incrementa entre un 80-90%, permitiendo así la proliferación indefinida de las mismas [98]. Estudios llevados a cabo en tejidos normales adyacentes a la zona tumoral, la expresión de la telomerasa resulta indetectable, corroborando su implicancia en la inmortalización de las células malignas. Se ha evidenciado que su reactivación es un evento frecuente y temprano durante la carcinogénesis, principalmente asociado al hábito tabáquico [99]. Además, altos niveles de expresión de hTERT y de su actividad se asocian a mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [100, 101].

1.2.4 Apoptosis

Las células son capaces de ingresar en apoptosis con la finalidad de regular el número de células en los tejidos y eliminar aquellos clones celulares innecesarios o envejecidos. Los defectos en este complejo, pero bien estudiado mecanismo, favorecen la expansión de clones celulares defectuosos y su consiguiente progresión hacia el fenotipo maligno.

Las alteraciones en la muerte celular programada permiten que las células neoplásicas sobrevivan mayor tiempo que una célula normal, sin la necesidad de factores exógenos y de la protección de la hipoxia o del stress celular; favoreciendo la expansión de la masa tumoral y la consiguiente acumulación de alteraciones genéticas. Al perturbarse la diferenciación celular, también se promueve la angiogénesis y aumenta la motilidad y la invasión tumoral.

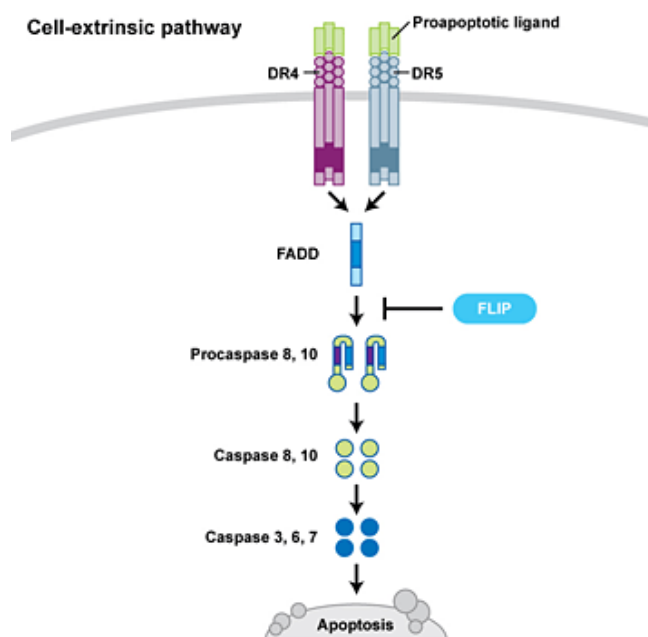
Existen dos vías en el mecanismo apoptótico: aquella en la que intervienen los receptores extracelulares, conocida como *vía extrínseca* y la *vía intrínseca* en que participan proteínas mitocondriales, ambas conectadas entre sí.

- **Vía extrínseca:** se han identificado dos receptores extracelulares, denominados receptores de la muerte, involucrados en esta vía de activación de la apoptosis.

Introducción

Uno de ellos es la proteína de transmembrana *Fas* que se activa tras la unión de su ligando extracelular, Fas ligando. Una vez activo dicho receptor se une a nivel intracelular con la proteína FADD (factor associated death domain). Esta unión desencadena la activación de la caspasa 8.

Otra forma de activación es a través del receptor de *TNF* (tumor necrosis factor). Su porción intracelular se conecta con el Tradd (TNF receptor associated death domain) que activan a las caspasas iniciadoras de la apoptosis (Figura 5).



La expresión de Fas ligando se asocio a mejor pronóstico [102], de igual manera que el análisis de la expresión de TNFR y su ligando, el TNF- α , se correlacionó con mejor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Figura 5: Esquema de vía extrínseca del mecanismo apoptótico

- **Vía intrínseca:** en la vía también llamada mitocondrial, las proteínas de la familia de *Bcl-2* se encargan de regular la apoptosis. La familia de proteínas de Bcl-2 esta constituida por proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad y Bid) y por proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w). Ante estímulos apoptóticos las proteínas pro-apoptóticas se activan y esto desencadena un aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. Como consecuencia, se liberan las proteínas intra-mitocondriales y entre ellas el citocromo c, que una vez en el citoplasma activa a las caspasas, encargadas de ejecutar la muerte celular (Figura 6).

Introducción

En condiciones normales estas proteínas son las responsables de mantener un equilibrio entre la vida y la muerte celular. En células que sobreexpresan Bax, se favorece la formación de heterodímeros que conducen a la apoptosis. La sobreexpresión de Bcl-2 y la pérdida de expresión de Bax en lesiones pre-neoplásicas se incrementan progresivamente a medida que aumenta el grado histopatológico de la displasia [103].

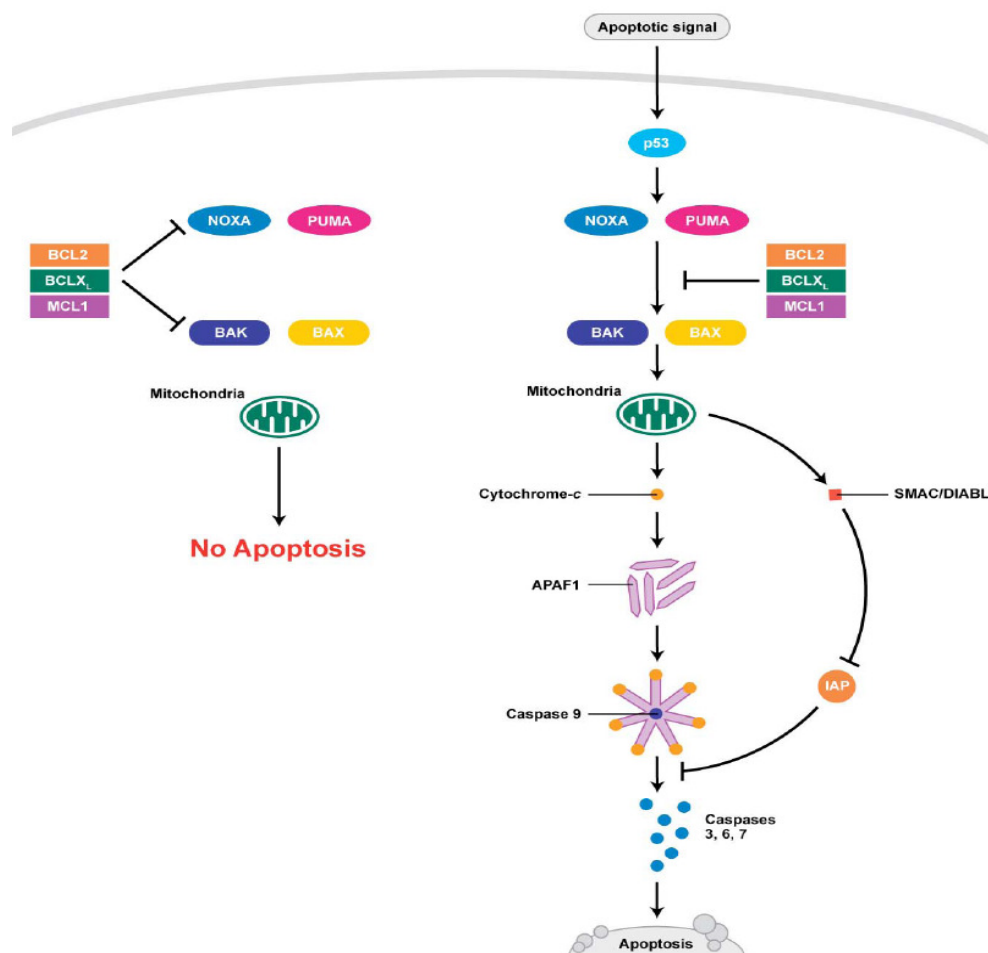


Figura 6: Esquema de la vía intrínseca del mecanismo apoptosis

Martin y colaboradores realizaron un metanálisis en el que se incluyeron 28 estudios desarrollados entre 1993 y 1999. Bcl-2 se expresa en un 39% de los casos de cáncer de pulmón estudiados: 71% en cáncer de pulmón microcítico, 55% en tumores neuroendocrinos y 35% en cáncer de pulmón no microcítico. La expresión de Bcl-2 se correlaciona con una mejor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico; sin

embargo los datos obtenidos de la expresión de Bcl-2 en pacientes con cáncer de pulmón microcítico resultan insuficientes para establecer un valor pronóstico [63].

Survivin es una proteína que inhibe la apoptosis mediante una inhibición directa o indirecta de las caspasas. Los niveles de expresión de esta proteína se encuentran incrementados en estadios tempranos de cáncer de pulmón no microcítico, razón por la cual se cree que su sobreexpresión podría ser importante durante la carcinogénesis [104]. Su elevada expresión se correlaciona con peor pronóstico y se ha observado una relación inversa entre los niveles de expresión de Survivin y Bcl-2 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, lo que sugiere que ambos inhibidores de la apoptosis actúan mediante diferentes vías en la regulación de la tumorigénesis [105].

1.2.5 Angiogénesis

Una vez constituida la masa tumoral, las células tumorales requieren de oxígeno y nutrientes para su crecimiento. A partir de la vasculatura pre-existente se comienzan a formar nuevos capilares que favorecerán el desarrollo de la masa tumoral. Existen factores secretados por el mismo tumor o por los tejidos adyacentes que regulan y mantienen el equilibrio del proceso.

a. Factores angiogénicos:

- **VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular):** se une con gran afinidad a receptores tirosina kinasa en la superficie celular, VEGFR, desencadenando su dimerización y posterior activación por transfosforilación. Su expresión se incrementa por hipoxia celular o diversos factores celulares o citoquinas. VEGF incrementa la permeabilidad y también interviene en la coagulación, la fibrinólisis y la apoptosis celular.

Se ha observado una sobreexpresión de VEGF en lesiones bronquiales pre-neoplásicas con ligero a moderado grado de displasia. En tumores, los niveles de expresión son mayores en carcinoma escamoso y adenocarcinoma que en los tumores neuroendocrinos, concordando con el mayor grado de vascularización [106].

Introducción

La sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial correlaciona con una peor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [107]. Además, la expresión intratumoral de las distintas clases de VEGF parecen tener importancia en los distintos subgrupos de cáncer de pulmón no microcítico [108].

- **PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas):** fue uno de los primeros factores de crecimiento en ser caracterizado [109]. Este potente factor de crecimiento es secretado por las plaquetas durante el proceso de coagulación. Incrementa la síntesis de ADN, regula la morfología y la migración de las células endoteliales y el crecimiento tumoral.

Koukourakis y colaboradores, observaron sobreexpresión de PDGF en aquellos tumores con mayor grado de vascularización. En pacientes con sobreexpresión de PDGF y nódulos negativos presentaron se asoció a peor pronóstico [110].

- **bFGF (factor de crecimiento de fibroblástico básico):** pertenece a una familia de factores de crecimiento implicados en la angiogénesis y el crecimiento tumoral, la cicatrización y el desarrollo embriológico.

En pacientes con adenocarcinoma se expresa en un 74% y correlaciona con una peor tasa de respuesta a 5 años y una peor supervivencia [111]. Volm y colaboradores estudiaron la expresión de bFGF y de su receptor (bFGFR) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Aquellos pacientes con elevada expresión del bFGFR presentaron una menor supervivencia, sin embargo no fue posible establecer una correlación significativa entre los niveles de expresión de bFGF y la supervivencia [112].

- **IL-8 (Interleuquina 8):** fue identificada en 1987 como una potente citoquina pro-inflamatoria involucrada en la quimiotaxis y la proliferación in vivo e in vitro [113]. Es secretada por diversas células como neutrófilos, monocitos, fibroblastos, células T, células endoteliales y epiteliales tras la exposición a un estímulo inflamatorio.

Introducción

La sobreexpresión de IL-8 y su participación en la angiogénesis ha sido demostrada en diversos tumores sólidos; como cáncer de pulmón [114], carcinoma escamoso de cabeza y cuello [115], cáncer colorectal [116], glioblastoma [117], y melanoma [118]. Elevados niveles de expresión de IL-8 correlacionan con un incremento en el grado de vascularización. Además se halló una importante asociación entre elevados niveles de IL-8 y otros factores como estadio de la enfermedad, presencia de metástasis en ganglios linfáticos distales, supervivencia y recaída postoperatoria; por lo que puede ser considerado un marcador pronóstico para el cáncer de pulmón no microcítico [119]. En otro estudio, si bien existe una correlación entre los elevados niveles de expresión de IL-8 y un incremento en la vascularización, dichos niveles no afectan al pronóstico de los pacientes [120].

b. Factores antiangiogénicos:

Las células tumorales son capaces de activar ciertos factores que inhiben el proceso angiogénico como la angiostatina y la endostatina, impidiendo la proliferación de las células endoteliales y favoreciendo la apoptosis.

- **Angiostatina:** se genera a través de la división proteolítica del plasminógeno circulante por enzimas liberadas desde éstas.

En piezas tumorales de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, la expresión de dicha proteína prolonga la supervivencia [121].

- **Endostatina:** Deriva de la porción carboxilo terminal del colágeno XVIII y se activa por clivaje mediante la acción de dos enzimas provenientes de las células tumorales [122].

Sin embargo los estudios llevados a cabo con pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en los que se investigó los niveles del precursor de la endostatina, el colágeno XVIII, muestran un peor pronóstico en aquellos pacientes con elevados niveles del mismo [123].

1.2.6 Invasión tisular y metástasis

Durante la progresión tumoral, ciertas células adquieren la capacidad de movilizarse, invadir los tejidos adyacentes y de ahí migrar a tejidos distales en los que se desarrolla una nueva masa tumoral. La recién formada masa tumoral está conformada por una amalgama de células cancerígenas y células de sostén propias del tejido en la que se ha asentado [124]

Hace unos años, se propuso que las células tumorales capacitadas para metastatizar debían sufrir un cambio en su fenotipo [125]. A través de una transición epitelial- mesenquimal (EMT) las células tumorales se diferencian a un fenotipo mesenquimal móvil y resistente a la apoptosis, para poder migrar hasta su sitio de metástasis y evitar así la muerte celular programada desencadenada tras la separación del tejido en el que se encuentran ancladas [126]. Una vez establecidas en su nuevo entorno, éstas son capaces de revertir su fenotipo a un estado no metastásico.

Sin embargo, muchas células tumorales son capaces de migrar de forma colectiva a los tejidos donde metastizarán, resultando ambos mecanismos trascendentes [127].

Durante este complicado proceso, las células tumorales sufren una alteración en la expresión de las **moléculas de adhesión** que median la interacción célula-célula y célula-matriz celular, resultando esto también en una alteración de las señales intracelulares.

- **Cadherinas:** son proteínas de transmembrana encargadas de mantener la unión célula-célula dependiente de calcio. Los dominios intracelulares interaccionan con otras proteínas permitiendo la unión al complejo de adhesión celular [128]. E-Cadherina está presente en células epiteliales y es responsable de la formación y mantenimiento de las estructuras epiteliales. Su pérdida de expresión a través diversos mecanismos es un evento frecuente en diversas neoplasias que comprometen al tejido epitelial [129].

La expresión de E-cadherina, α -catenina, γ -catenina, no así la de β -catenina, se reduce en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Además se

Introducción

pudo hallar una asociación entre el grado de expresión del complejo E-cadherina/ α -catenina y el tipo histológico [130]. También se correlacionó la presencia de un fragmento soluble de 80 kDa de E-cadherina en suero de pacientes con cáncer de pulmón y distintos tipos histológicos. E-cadherina podría estimular de esta manera la actividad de la metaloproteasas favoreciendo la invasión celular [131].

Simultáneamente a la pérdida de expresión de E-cadherina, se ha observado la sobreexpresión de N-cadherina [132]. Tras la expresión de esta molécula, se estimula la activación de receptor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), resultando en una activación de las vías de señalización de la PLC γ , PI3K y MAPK, que promoviendo la migración e invasión celular [133].

– **CAM:** son moléculas de adhesión celular que forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Sus cambios de expresión juegan un papel importante en la proceso de invasión y metástasis [133].

La N-CAM puede unirse al igual que N-cadherina a FGFR en células neuronales y tumorales, desencadenando la activación de la β_1 integrina de la matriz extracelular. Sin embargo los mecanismo moleculares que desencadenan esta interacción son poco conocidos hasta el momento [134].

– **Integrinas:** Son receptores heterodiméricos constituidos por dos subunidades de transmembrana, α y β , que forman uniones de diferentes ligandos de la matriz extracelular [133] y regulan señales intracelulares que controlan la organización del citoesqueleto y la supervivencia [135].

La degradación de la membrana basal requiere la activación de proteasas y de sus correspondientes inhibidores, para evitar la excesiva degradación de la matriz celular. MMP-2 y MMP-9 muestran una importante actividad enzimática por el colágeno tipo IV, principal constituyente de la membrana basal. Estas moléculas son secretadas como zimógenos y activadas entre otros factores por las propias integrinas [135].

Introducción

La expresión de las integrinas durante la carcinogénesis es variable. Algunas integrinas como $\alpha_6\beta_4$ y $\alpha_v\beta_3$ incrementan su expresión durante este proceso, mientras que otras como $\alpha_5\beta_1$ dejan de expresarse por completo en la superficie de las células [135]. Investigaciones han demostrado que la falta de expresión subunidad α_3 integrina contribuye a incrementar la tumorogénesis de oncogén c-myc en el cáncer de pulmón microcítico. $\alpha_3\beta_1$ integrina juega un papel importantísimo en el desarrollo y la integridad del epitelio pulmonar, por lo que su baja expresión está relacionada con un fenotipo más agresivo de cáncer de pulmón microcítico. El aumento de la expresión de $\alpha_1\beta_1$ y de $\alpha_2\beta_1$ se correlacionó con un incremento de la capacidad metastásica de carcinoma escamoso de pulmón [136].

El **sistema inmune** cumple una doble función en el progreso tumoral, por un lado impide el crecimiento tumoral por un mecanismo de adaptación inmunológica y por otro coadyuva la progresión tumoral a través del sistema inmune innato, generado por la respuesta inflamatoria [137].

Existe evidencia de que la inflamación, generada tras infecciones crónicas o tras la exposición a diversos agentes irritantes, puede ser uno de los desencadenantes del proceso tumoral. Los macrófagos son los responsables de mediar esta respuesta inflamatoria generando elevadas cantidades radicales libres, involucrados en la mutagénesis del ADN celular [138].

La presencia de monocitos o de sus formas activas, macrófagos asociados al tumor (TAMs), resultan ser de mal pronóstico. Los macrófagos son reclutados por medio de factores quimiotácticos por las celulares tumorales. Los TAMs migran a zonas de hipoxia estimulando la angiogénesis mediante la expresión de VEGF, Angiopoyetina 1 y 2 [139]. También son los responsables de aglomerar a otras células hematopoyéticas, como neutrófilos, que colaboraran con este proceso. Estimulan la expresión de MMP y de catepsinas, que favorecen la ruptura de la membrana basal [140]. La secreción diversos factores de crecimiento y quimioquinas, como EGF, TGF β , IL8 TNF α contribuye a la extravasación de las células tumorales, primordial en el proceso de invasión y metástasis [141]. Recientemente se ha confirmado que existe una retroalimentación paracrina entre las

Introducción

células tumorales y los macrófagos durante los estadios iniciales del proceso metastásico. [142].

Otro punto a considerar es la capacidad que tiene las células tumorales de colonizar en determinados tejidos con cierta predilección. Algunas de estas “preferencias” pueden explicarse al considerar las vías sanguíneas y de drenaje linfático. En otros casos no sucede así. Numerosas investigaciones avalan la teoría de que estas células tumorales pueden unirse a las células endoteliales o membranas basales de determinados tejidos, invadir o responder a estímulos de crecimiento sólo si expresan los receptores correspondientes para ello [143]. Recientes estudios en microarreglos de ADN con células de cáncer de mama capaces de metastatizar de manera específica en determinados órganos, han mostrado importantes hallazgos. El perfil genético elaborado permitió observar qué combinaciones de genes son necesarias para favorecer la metástasis en un sitio específico, ya que la expresión de un solo gen no resulta propicia para el desarrollo de la misma [144, 145].

El estudio precoz de todas estas alteraciones genéticas y epigenéticas que se suceden durante el proceso carcinogénico, permitirá encontrar nuevos biomarcadores y establecer perfiles genéticos para el seguimiento y tratamiento individualizado de los pacientes.

1.3 IMPORTANCIA DEL ADN TUMORAL CIRCULANTE

1.3.1 Primeras investigaciones

En un principio, la identificación de ácidos nucleicos en plasma fue un hecho poco reconocido. Mandel y Métais determinaron por primera vez la presencia de ADN y ARN en el plasma de pacientes, previa precipitación con ácido perclórico [146]. Sin embargo, la investigación de ADN circulante fue abandonada por muchos años hasta que comenzó a tomar importancia en el área de la inmunología, en enfermedades como el lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoidea [146].

Trascurrieron varios años hasta que en 1977 un grupo de investigadores de Filadelfia, demostró que existía una correlación entre niveles de ADN en suero y la respuesta a la radioterapia en pacientes con cáncer en diversas localizaciones. En general, la disminución de los niveles de la concentración de ADN en suero, de hasta el 90%, se traducía en una mejoría clínica (disminución del tamaño del tumor y del dolor) después de la irradiación; mientras que en aquellos pacientes en los cuales los niveles se mantenían o aumentaban post irradiación, la respuesta al tratamiento era nula e indicativo de mal pronóstico [147]. Stroun y colaboradores, fueron los primeros en hallar ADN con alteraciones neoplásicas en plasma de pacientes [148].

Años más tarde, se identificaron secuencias mutadas de oncogenes en plasma de pacientes con cáncer de páncreas. A partir de aquí, se continuó investigando la presencia de mutaciones en plasma o suero de diversos tipos de cáncer con iguales resultados. Así se pudo confirmar que es posible identificar ADN derivado de tumor en suero o plasma de pacientes con cáncer [149]. Ante la posibilidad de que se tratase de ADN de origen linfocitario, se valieron de las diferencias entre las propiedades del ADN de origen tumoral y de células normales. El primero se caracteriza por una gran inestabilidad en sus hebras y mayor capacidad de síntesis en presencia de determinados carcinógenos [150].

1.3.2 Origen de los ácidos nucleicos circulantes

Si bien no se sabe con certeza cuál es el mecanismo por el cual estos ácidos nucleicos son eliminados y vertidos a circulación hay varias hipótesis acerca de su origen.

1. lisis de células cancerosas o la eliminación de micrometástasis por el tumor. Sin embargo, el número de células que deberíamos encontrar en circulación debería ser enorme para que se correlacionaran con las cantidades de ADN halladas en plasma. Se llegó a calcular que de acuerdo a la cantidad de ADN hallada en pacientes con cáncer de páncreas, debería haber aproximadamente mil células cancerígenas por mililitro, que es mucho más que lo que realmente puede encontrarse [151]

2. necrosis, debido a que se hallan importantes cantidades de ADN en pacientes con estadios avanzados. Sin embargo, los valores plasmáticos del ADN tumoral disminuyen tras la radioterapia, cuando debería esperarse un incremento, si la necrosis fuera la principal causa de su liberación.

3. apoptosis, el ADN del plasma o suero presenta un patrón de electroforesis semejante al de las células apoptóticas como resultado de la fragmentación del ADN genómico.

Para corroborar si el ADN provenía de un proceso necrótico o apoptótico se desarrollaron diversas investigaciones:

- Se trabajó con células de origen tumoral, a las que se les indujo apoptosis o necrosis. Tras medir el ADN liberado por fluorimetría, se observó que las células a las que se les había inducido el proceso apoptótico liberaban mayor cantidad de ADN que las células necróticas y que dicho ADN mostraba un patrón de fragmentos de bajo peso molecular [152].
- En otro estudio, se cuantificó el promotor de un gen supresor de tumor en plasma de pacientes con cáncer y se evidenció escasa cantidad de ADN de origen tumoral en el plasma. El mismo grupo de trabajo llevó a cabo estudios con células apoptóticas y necróticas in vitro y con modelos animales, para comprobar el origen del ADN plasmático. Fue posible distinguir el patrón de

ADN originado por apoptosis o por necrosis. El primer proceso produce múltiples fragmentos de ADN de aproximadamente 180 pb; mientras que por el segundo los fragmentos son mucho más extensos. Ambos tipos de fragmentos se encuentran en el plasma de los pacientes con cáncer [153].

- Investigaciones recientes afirman que los macrófagos son los responsables de la liberación de los ácidos nucleicos a circulación, después del proceso de muerte celular. Se pudo observar que los fragmentos con mutaciones hallados en plasma son de bajo peso molecular, mientras que aquellos de mayor peso molecular provienen de ADN tipo “salvaje”. Los fragmentos de ADN mutado podrían originarse tras la digestión parcial de las células tumorales en necrosis por parte de los macrófagos y esto explicaría la liberación de una mayor cantidad de ADN [154].

4. **secreción activa** a circulación, podría tener el mismo mecanismo que se observa *in vitro* por el que los linfocitos liberan ADN al medio sin ningún tipo de estimulación. Existen varias razones que apoyan la idea de que se trata de una resíntesis y no de ADN proveniente de células en apoptosis o necrosis [155]. Cultivos de células de pacientes con leucemia liberan más ADN al medio que las células de pacientes normales utilizadas como control. De tratarse de un proceso de secreción activa por parte de las células tumorales, tiene lógica hallar valores más elevados de ADN circulante en pacientes con cáncer que en controles sanos [146].

La presencia de ADN en el plasma/suero de los pacientes con cáncer es probablemente el resultado variados mecanismos por los cuales se favorece la salida o excreción de los ácidos nucleicos a circulación.

1.3.2 **Cuantificación de los ácidos nucleicos circulantes**

Llevo muchos años establecer una técnica que resultara confiable, sensible y sencilla para la determinación de los ácidos nucleicos en plasma o suero. Primeramente se emplearon técnicas fluorométricas y colorimétricas que resultaban poco específicas y muy complejas técnicamente [156, 157], ya que los reactivos reaccionaban de igual manera con otros componentes sanguíneos [158]. Las técnicas inmunológicas como

Introducción

inhibición de la hemoaglutinación, fijación de complemento, inmunodifusión tampoco lograron incrementar la sensibilidad. Se necesitó de técnicas más sensibles como hibridización, contraelectroforesis y radio inmuno ensayo (RIE), que incrementaron la detección hasta el orden de los nanogramos para poder cuantificar los ácidos nucleicos circulantes [159-161]. Actualmente el empleo de la PCR en tiempo real y PicoGreen permiten cuantificar cantidades de ADN del orden de los picogramos [162-164].

Desde que en 1977 León y colaboradores estudiaron por primera vez los niveles de ADN en plasma de pacientes con cáncer y un grupo controles sanos por RIE, y encontraron niveles más altos en pacientes con cáncer y que dichos niveles decrecían tras la administración de radioterapia [147], se sucedieron numerosos estudios con la finalidad de cuantificar los niveles de ADN y tratar de hallar una correlación con parámetros clínicos. En todos ellos, los valores de ADN en plasma o suero de pacientes con cáncer de pulmón son mayores que los de controles sanos o pacientes con patologías benignas [162, 165-167]. Además los pacientes con enfermedad metastásica presentan valores más elevados [147]. En sólo un estudio los valores hallados en pacientes con enfermedad pulmonar benigna muestran valores más altos que pacientes con cáncer de pulmón [168].

Existe disparidad de resultados debido a las distintas técnicas empleadas para su cuantificación y su posterior análisis, lo que dificulta la comparación de los datos obtenidos. Sólo tres estudios emplean la misma técnica para la detección de niveles de ADN circulante (PCR en tiempo real); sin embargo los tres trabajos emplean diferentes genes para la amplificación [164, 167, 169].

No se ha podido establecer una correlación entre los niveles plasmáticos de ADN y los subtipos histológicos, con excepción de un trabajo en el que se presentan niveles mas elevados en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico que en aquellos con cáncer de pulmón microcítico [163]. En sólo dos estudios se han encontrado niveles más elevados de ADN en plasma de pacientes con estadios avanzados [163, 165]. Sozzi y colaboradores han encontrado una significativa correlación entre los niveles plasmáticos de ADN la edad y el recuento leucocitario al emplear RT PCR en pacientes con cáncer de pulmón [167]. Las mayores diferencias de resultados obtenidos se observan al intentar correlacionar supervivencia y niveles de ADN plasmático. Para

Introducción

algunos autores no es posible establecer una asociación entre las concentraciones plasmáticas y la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad [162, 166]. Para otros autores existe una correlación entre los valores plasmáticos de ADN y la supervivencia [165, 169].

Otro punto a considerar es la relación entre concentraciones de ADN circulante y respuesta al tratamiento. Se observó que tras radioterapia, las concentraciones en suero de ADN circulante descienden un 75% en pacientes con cáncer de pulmón que responden al tratamiento y se incrementan en un 25% en aquellos que progresan [147]. Las concentraciones de ADN plasmáticas también tienden a disminuir en pacientes libres de enfermedad al compararlas con aquellos pacientes que recaen post cirugía [167]. Gautschi y colaboradores realizaron comparaciones entre los niveles plasmáticos y séricos de ADN circulante en pacientes post quimioterapia. En aquellos pacientes con enfermedad estable los niveles séricos disminuían pero los niveles plasmáticos se mantenían iguales. En pacientes que no respondían al tratamiento, sólo se producía un incremento de los niveles plasmáticos mientras que los niveles séricos no sufrían modificaciones [169].

En la tabla a continuación se resumen algunos de estos estudios, los estudios han sido dispuestos en orden cronológico.

Introducción

Nº de pts	Muestra	Controles (ug/l)	Pacientes (ug/l)	Método	Correlaciona	No correlaciona	Conc post tratamiento (ug/l)	Referencia
33	suero	13	164 (Dif Tu)	RIE	Enfermedad metastásica	Tamaño, histología localización	(RT) ↑ 25% sin Rta ↓ 75% con Rta	[147]
68	plasma	10	30	Slot dot hibridization	LDH, supervivencia			[165]
84	plasma	18	318	ADN Dipstick		Edad, histología, estadio, supervivencia	(CX) 34	[166]
100	plasma	3,1	24,3	RT-PCR	Edad, grado de vascularización, recuento leucocitario	Estadio, histología, hábito tabáquico	(CX) 8,4	[167]
34	plasma	78	157	Pico Green		Estadio, histología, supervivencia	No se evaluó	[162]
185	plasma	12,6	39,6	RT-PCR	LDH, estadios avanzados, peor supervivencia		(QT) ↑ sin rta = con rta	[169]
185	suero	1,8	3,7		Recuento leucocitario		↓ con rta = sin rta	
26	plasma	38	82 209 (Tu) (EB)	Fluorescencia	No se evaluó	No se evaluó	No se evaluó	[168]
67	plasma	11,6	110,7	Pico Green	> en CPNM, sólo Estadio IV	Estadio, histología	No se evaluó	[163]
25	Plasma	10,6	14,6	RT-PCR		Estadio, histología	No se evaluó	[164]

Tabla 4: Cuantificación de los ácidos nucleicos circulantes

Como se ha mostrado hasta ahora, la cuantificación de los ácidos nucleicos circulantes puede ser una herramienta útil en la evaluación de la respuesta de los pacientes a quimio/radioterapia, pero no debemos olvidar que debe estar siempre asociada a la determinación de otro parámetro clínico y/o analítico, así como también a la investigación de marcadores moleculares.

1.3.4 Detección de alteraciones genéticas tumorales en sangre periférica

Stroun y cols, determinaron por primera vez la presencia de alteraciones tumorales en los ácidos nucleicos circulantes en pacientes con cáncer [148]. Hasta la actualidad son muchas las alteraciones genéticas y epigenéticas halladas en concordancia en suero y tumor de los pacientes con cáncer.

– Mutaciones en oncogenes

La presencia de mutaciones de oncogenes en ADN circulante en gran variedad de tumores es una prueba más del valor del vertido de dichos ácidos nucleicos tumorales a circulación.

Se estudiaron fundamentalmente las mutaciones de Ras. Dichas mutaciones cobran vital importancia debido a que es un gen que se encuentra frecuentemente mutado en diversos tumores. Las mutaciones de K-ras, como se comentó con anterioridad, se asocian a peor supervivencia en cáncer de pulmón no microcítico avanzado [170] y la posibilidad de su hallazgo en ADN circulante es una herramienta muy útil para facilitar el pronóstico de estos pacientes.

Sin embargo, los datos de los trabajos que describen la presencia de dichas mutaciones en suero o plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico son un poco controvertidos.

En dos estudios no ha podido establecerse una relación entre las mutaciones halladas en tejido pulmonar y el plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [171, 172]. Trombino y colaboradores además comprobaron que no existía una diferencia significativa en la frecuencia de las mutaciones de K-ras en plasma de sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [172].

Tampoco se ha podido establecer una correlación entre la presencia de dichas

Introducción

mutaciones y respuesta, progresión libre de enfermedad o supervivencia global en un grupo de 67 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado [173]

Por el contrario, Ramírez y colaboradores hallaron una mayor frecuencia de dichas mutaciones en suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico que en el correspondiente tumor primario y la presencia de dichas mutaciones se correlacionaba con un peor pronóstico [170]. Otro grupo de investigación también encontró una importante correlación entre la presencia de las mutaciones de K-ras en plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y la supervivencia global [174].

Otro gen cuyas mutaciones también se analizaron en plasma es p53. En un primer estudio llevado a cabo por Silva y colaboradores se investigó la presencia de mutaciones en los exones 5-8 de p53 en muestras de plasma y tumor de pacientes con cáncer de mama y de pulmón microcítico. En este estudio se halló una concordancia del 50% entre los resultados hallados en tumor y plasma [175]. En otros dos estudios se estudiaron conjuntamente las mutaciones de p53 en los exones 5-8 y alteraciones de microsatélites en el cromosoma 3p [176, 177]. En uno de ellos la presencia de ambas alteraciones (mutaciones de p53 y alteraciones de microsatélite) en pacientes con cáncer de pulmón microcítico se asocia a una mejor supervivencia en comparación con aquellos pacientes que presentan sólo una de las dos alteraciones [177]

En el cuadro a continuación se resumen algunos de estos estudios llevados a cabo en cáncer de pulmón en orden cronológico.

Introducción

Nº de pacientes	Muestra	Gen analizado	Método empleado	Hallazgos		Correlaciona	Ref.
				Tejido	Plasma o suero		
51 NSCLC	Tejido/Suero	K ras (codón12)	PCR enriquecida	18%	23%	Se asocia a peor supervivencia	[170]
35 NSCLC	Tejido/Plasma	K ras(codón12)	PCR enriquecida	31%	0%		[171]
25 NSCLC	Tejido(13)/Plasma	K ras (codón12)	RFLP/PCR		20%	Se asocia a peor supervivencia	[174]
138 NSCLC	Tejido (7)/ Plasma	K ras (codón12)			10%		
12 NSCLC	Tejido/Plasma	Kras (codón12)	Comparación de 2 Columnas ; ER+PCR	17%	0% vs 17%	No existe correlación entre los dos métodos empleados	
10 NSCLC	Tejido/Plasma	Kras (codón12)	ER+PCR			No se halló correlación entre las mutaciones del plasma y suero	[172]
36 Cáncer	Plasma		ER+PCR		42%	No existe diferencia significativa entre las mutaciones halladas en pacientes y controles	
40 Sin cáncer	Plasma		ER+PCR		30%		
67 NSCLC		K ras (codón12)	Secuenciación		30%	No se hallo correlación ni con respuesta, progresión libre de enfermedad o supervivencia global	[173]
10 SCLC	Solo Plasma	P53 (exón 5-8)	PCR-SSCP		10%		[175]
64 NSCLC	Tejido/Plasma	P53 (exón5-8)	Secuenciación	41%	30%		[176]
35 SCLC	Tejido/Plasma	P53(exón 5-8)	PCR-SSCP	20%	37%	Presencia de mutaciones en p53 y MA se asocia a peor supervivencia	[177]

Tabla 5: Análisis de mutaciones de oncogenes en ácidos nucleicos circulantes

– **Análisis de microsatélite**

Son loci polimórficos que consisten en repeticiones de entre uno a seis nucleótidos ubicados en tándem en zonas no codificantes del ADN. El microsatélite más común consiste entre diez a miles de repeticiones de citosina y adenina a lo largo del genoma. Las alteraciones de los microsatélites pueden expresarse como un desequilibrio alélico o pérdida de heterocigosidad. Si bien su función biológica no se ha podido determinar con exactitud, se los emplea como marcadores genéticos por vinculación a genes supresores de tumor u oncogenes ubicados en sus proximidades.

Desde que en 1996 dos grupos independientes confirmaron que existía una concordancia entre la pérdida de heterocigosidad hallada en tumor y plasma o suero de pacientes con cáncer de pulmón y de cabeza y cuello respectivamente, se han sucedido numerosas investigaciones con la finalidad de corroborar estos datos [178, 179].

Resulta un poco complejo realizar una comparación de los datos obtenidos de los distintos grupos de investigación, ya que se han estudiado diversas y numerosas localizaciones de las alteraciones de microsatélite.

El hallazgo de estas alteraciones en plasma de un grupo de pacientes con estadio temprano de cáncer de pulmón fue del 28% [180], similar al hallado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello [179]; pero menor al 71% hallado por Chen y colaboradores [178]. Sozzi y colaboradores hallaron alteraciones tumorales en concordancia con las alteraciones encontradas en plasma en un 61% de los casos analizados, las cuales no se identificaron en el plasma de los controles sanos. Si bien no pudo establecerse una correlación entre la frecuencia de las alteraciones de microsatélite en plasma y el estadio tumoral o la histología, se identificaron alteraciones de microsatélite en plasma en un 43% de pacientes con estadio I y hasta un 45% con tumores mayores a 2cm [181].

En pacientes con cáncer de pulmón microcítico se halló concordancia entre los hallazgos de dichas alteraciones en tumor primario y plasma. A pesar de que no se encontró una diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes con y sin alteraciones en plasma, aquellos pacientes que presentaban concomitantemente alteraciones de microsatélites y mutación en p53 tenían peor supervivencia que aquellos con sólo una de estas alteraciones en plasma. Además en un grupo de ellos fue posible establecer una relación entre la respuesta al tratamiento y la desaparición de dichas alteraciones en plasma o progresión y persistencia en plasma de las mismas [177]. Similares resultados se obtuvieron en un grupo de pacientes con cáncer de pulmón no

Introducción

microcítico [166, 176].

Estos hallazgos se corroboran con los encontrados en paralelo en muestras de mucosa bronquial y plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico empleando 4 marcadores diferentes y con una sensibilidad de 40%[182].

Beau-Faller y colaboradores analizaron un panel de 12 alteraciones de microsatélite localizados en 9 regiones cromosomales diferentes en plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y microcítico, incrementando la sensibilidad a un 88%. Ninguno de los 20 controles sanos presentó alteración de microsatélite en plasma. Además, se estableció un panel más reducido de dichas alteraciones para cáncer de pulmón no microcítico (5q, 9p, 9q, 20q) y cáncer de pulmón microcítico (3p, 5q, 9p, 9q, 17 p) con elevada sensibilidad [162].

A continuación se resumen algunos de los resultados de estos estudios.

Introducción

Nº de pacientes	Muestras	Microsatélite analizado	Método empleado	Hallazgos				Implicancias	Ref
				Tumor	Total	Plasma o suero	Total		
21 SCLC	Tejido/plasma	UT762 ACTBP2 AR	PCR	52% 29% 28%	76%	48% 19% 33%	71%	Requiere de un análisis con mayor número de muestras	[178]
22 NSCLC	Tejido/suero	D3S1038 D3S1611 D3S1067 D3S1284	PCR	18% 27% 27% 27%	54%	9% 18% 23% 14%	28%	Solo en un paciente las alteraciones en suero se presentaron con anterioridad al hallazgo de las metástasis dístales	[180]
87 NSCLC	Tejido/plasma	D21S1245 D3S1300 D3S4103 D3S1234	PCR		56%		34%	No se asocia con estadio ni con histología. Se detecta en plasma de un 43% de los pacientes con estadio I y 45% de tumores de hasta 2 cm. de diámetro.	[177]
14 EPB	Tejido/plasma	D21S1245 D3S1300 D3S4103 D3S1234	PCR		7%		0%	No alteraciones en plasma de individuos sanos.	
35 SCLC	Tejido/plasma	ACTBP2 UT762 X (AR)	PCR	25% 31% 19%	29%	17% 34% 17%	51%	No hay diferencias en supervivencia entre los pacientes con o sin alteraciones en el plasma. Presencia de mutaciones en p53 y MA se asocia a peor supervivencia.	[181]
84 NSCLC	Tejido/plasma	D3S1300 D3S1289 D3S1266 D3S1238 D3S1304	PCR	9/20 tienen iguales alteración en plasma que en suero			61%	Las alteraciones de microsatélite correlacionan con el estadio clínico de los pacientes post cirugía.	[166]
64 NSCLC	Tejido/plasma	D3S1300 D3S1289 D3S1266 D3S2338 D3S1304	PCR		62%		50%	Concordancia en un 47,5% de los pacientes entre los hallazgos en suero y plasma.	[176]
30 Cáncer de pulmón	Biopsia bronquial/plasma	GPX1 D3S1259 D13S227	PCR	27% 23% 27%	43%	10% 8% 13%	41%	Concordancia en un 40% en las alteraciones en plasma y biopsia bronquial de pacientes con cáncer de pulmón.	[182]

Introducción

24 Cáncer de pulmón	Tejido/plasma	D3S1293		46%		33%	El empleo de 6 marcadores incrementa la sensibilidad un 85%. Diferentes alteraciones de microsatélite para cáncer de pulmón no microcítico y microcítico.	[162]	
		D3S3700		50%		46%			
		D3S1283		42%		37%			
		D5S346		50%		46%			
		D9S171		29%		37%			
		D9S179	PCR	33%	83%	17%			79%
		D17S800		17%		37%			
		D17S1818		37%		17%			
		D20S108		17%		25%			
		D20S170		8%		25%			

Tabla 6: Análisis de alteraciones de microsatélite en ácidos nucleicos circulantes

– **Análisis de la hipermetilación de zonas promotoras de genes supresores de tumores y de reparación de ADN**

La epigenética comprende cambios en el patrón de expresión genética sin alteraciones en la secuencia nucleotídica. Dentro de las alteraciones epigenéticas, la metilación está asociada al silenciamiento génico. Muchos de los genes frecuentemente metilados están involucrados en la regulación del ciclo celular o en las vías de reparación del ADN [183]. El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación (MS-PCR) [184], ha permitido detectar pequeñas secuencias de ADN metilado en plasma o suero de pacientes con cáncer.

Esteller y colaboradores describieron por primera vez la presencia de hipermetilación de p16, DAP kinasa, GSTP1 y MGMT en suero de pacientes con cáncer de pulmón independientemente del estadio tumoral. Dichas alteraciones mostraban concordancia con las halladas en el tumor primario correspondiente y no se detectaron en tejido pulmonar normal [185].

Se intentó correlacionar la presencia de alteraciones epigenéticas en plasma o suero de pacientes y controles sanos con el riesgo de padecer cancer de pulmón. El porcentaje de hipermetilación aberrante de RAR β , p16, DAPK, RASSF1A y MGMT en un grupo de 100 pacientes con cáncer de pulmón resultó ser significativamente mayor que para un grupo de 100 pacientes con enfermedad pulmonar benigna. Además aquellos pacientes con al menos un gen metilado presentan 5 veces mayor probabilidad de desencadenar cáncer de pulmón que aquellos que no presentan ningún gen metilado [186]. Otros investigadores también encontraron una elevada asociación entre la metilación de multiples genes en esputo y el riesgo de padecer cáncer de pulmón. También fueron los primeros en determinar la presencia de hipermetilación de genes en ADN circulante de pacientes no fumadores, quizás debido al empleo de mayores cantidades de ADN y una modificación de la técnica empleada, la MS-PCR anidada. Cabe destacar que si bien estos pacientes eran no fumadores, presentaban alguna otra patología que podría ser la responsable de la metilación de alguno de los genes investigados [187].

Con el empleo de técnicas cuantitativas se eliminan posibles falsos positivos que pueden suceder con el empleo de la MS-PCR convencional. La hipermetilación de APC en suero pudo ser detectada en casi la mitad de los pacientes con cáncer de pulmón de los que se disponía de suero, existiendo concordancia con los resultados hallados en el tejido correspondiente. Ninguno de los controles sanos presentó hipermetilación en la

Introducción

zona promotora de APC [188]. Bearzatto y colaboradores analizaron la hipermetilación de p16 en plasma de un grupo de 35 pacientes con cáncer de pulmón no micocítico y de 15 controles sanos. La hipermetilación de p16 se detectó en 12 de los 22 pacientes que presentaban hipermetilación en el tumor. No se detectó hipermetilación de p16 en el suero de los 15 controles sanos [171].

En un estudio llevado a cabo en 115 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado se observó que 14-3-3 σ se encontraba metilado en el 34% de los pacientes independientemente del tipo histológico. La metilación de dicho gen se asoció a mejor supervivencia. Al dividir los pacientes en respondedores y no respondedores al tratamiento (gemcitabina/cisplatino) los respondedores no metilados, presentaron casi 5 veces más posibilidades de morir que los respondedores metilados para este gen [189].

A continuación se resumen alguno de estos estudios en orden cronológico.

Introducción

Nº de pacientes	Muestras	Gen analizado	Método empleado	Hallazgos			Implicancias	Ref	
				Tumor	Plasma o suero				
22 NSCLC	Tejido/plasma	P16	MS-PCR	41%	68%	14%	No falsos positivos en los 22 tejidos/ plasma analizados	[185]	
		DAPK		22%		18%			
		GSTP1		9%		5%			
		MGMT		27%		18%			
99 Ca de pulmón	Tejido/ suero o plasma	APC	Q-MS-PCR		96%		47%	No metilación en 50 controles sanos Solo la metilación en tejido se asocia a mejor supervivencia	[188]
35 NSCLC	Tejido/plasma	P16	MS-PCR		57%		10%	No falsos positivos de plasma de pacientes sin alteraciones en tumor No metilación en los controles sanos	[171]
115 NSCLC	Suero	14-3-3 σ	MS-PCR				34%	Metilación se asocia a mejor supervivencia	[189]
100 NSCLC	Suero	MGMT				19%	La edad y el hábito tabáquico se asocian al estatus de metilación. Aquellos con al menos un gen metilado tienen 5 veces mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón Se detectan un 51% de los pacientes en estadio I	[186]	
100 Enf benigna	Suero	P16		15%					
		RASSF1A		12%					
		DAPK		11%					
		RAR β		6%					
		MGMT	MS-PCR			2%			
		P16				3%			
		RASSF1A				8%			
		DAPK				5%			
		RAR β				1%			
56 NSCLC estadio I	Espuito/plasma	P16		19%		25%	Los pacientes con cáncer de pulmón tienen mayor posibilidad de presentar más de un gen metilado en plasma y en esputo que los no fumadores. Se detectan bajos porcentajes de metilación en plasma de no fumadores.	[187]	
		MGMT		36%		11%			
		RASSF1A		25%		7%			
121 fumadores	Espuito/plasma	P16	MS-PCR	25%		13%			
		MGMT	ANIDADA	14%		12%			
74 no fumadores	Espuito/plasma	RASSF1A		7%		2%			
		P16				9%			
		MGMT				3%			
		RASSF1A				3%			

Tabla 7: Análisis de hipermetilación aberrante en genes supresores de tumor en ácidos nucleicos circulantes

1.3.5 Perspectivas en el análisis del ADN tumoral circulante

Todos estos estudios llevados a cabo por distintos grupos de investigadores y en diferentes poblaciones demuestran la importancia del análisis de los ácidos nucleicos circulantes. A través de una muestra sumamente accesible, como es la sangre periférica, es posible detectar alteraciones tumorales no sólo en fases tempranas de la patología, sino que también se ha descrito el hallazgo de alguna de estas alteraciones en los estadios premalignos.

Son muchos los estudios en los que se evaluaron los niveles de ácidos nucleicos circulantes y las distintas alteraciones moleculares de origen tumoral halladas en plasma o suero de pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, resulta imposible llevar a cabo una comparación debido a la disparidad de marcadores analizados y las distintas técnicas empleadas para tal fin. Por ello es necesario desarrollar estudios en los que se validen y estandaricen las técnicas empleadas, se evalúen nuevas técnicas más sensibles y específicas y se busquen nuevos marcadores moleculares de manera prospectiva.

Es indispensable desarrollar más investigaciones con la finalidad de hallar nuevos marcadores moleculares en sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón. El empleo de los mismos de manera rutinaria permitirá realizar un diagnóstico precoz y no invasivo, individualizar el tratamiento circunscribiendo subpoblaciones de pacientes sensibles a determinados fármacos y realizar un seguimiento del paciente durante el tratamiento hasta la recaída.

1.4 METILACIÓN DEL ADN Y SILENCIAMIENTO GÉNICO

Durante el proceso oncogénico, las diferentes alteraciones genéticas que se producen determinan modificaciones en la expresión de genes en las células tumorales [190]. La falta de expresión de un gen se relaciona en muchos casos con la presencia de mutaciones puntuales o deleciones, aunque también está ligada a cambios epigenéticos en el ADN, que son cambios en el patrón de expresión genética sin alteraciones en su secuencia nucleotídica [183].

Uno de estos cambios epigenéticos es la metilación del ADN en la región promotora de sus genes, donde se inicia el proceso de transcripción tras la unión con la RNA polimerasa [183].

1.4.1 Aspectos generales de la metilación

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo en el carbono 5' del anillo de citosina, transformándose en 5`metil-citosina. Esta modificación postranscripcional, ocurre en aquellas citosinas que preceden a una guanosina en la secuencia de ADN (dinucleotidos CpG).

Es un proceso indispensable para el desarrollo normal de las células y sumamente controlado. Los patrones de metilación se establecen tempranamente durante la embriogénesis. En las etapas tempranas de la división celular, se desencadena una demetilación del ADN parental, seguida de una metilación de “novo” de CpG específicas. Si bien se pensaba que una vez establecidos los patrones de metilación, estos se mantenían a lo largo de las divisiones celulares, estudios posteriores indicaron que existe un verdadero equilibrio entre la demetilación y la metilación de “novo” en cada ciclo celular creando un patrón de metilación heterogéneo [191].

No todos las CpG del genoma son susceptibles a ser metilados durante la embriogénesis. El genoma parece estar sectorizado en zonas más susceptibles a sufrir este proceso. Los sectores con mayor porcentaje de metilación coinciden con regiones

de baja expresión génica, mientras que aquellos sectores no metilados se asocian a elevada expresión génica. Las secuencias repetitivas del genoma que comprenden a regiones codificantes y promotores de genes específicos de tejido (representan aproximadamente el 35% del genoma) se encuentran frecuentemente metiladas [192]. Por el contrario, las CpG de los islotes que comprenden a los promotores y primeros exones de los genes constitutivos permanecen no metiladas. En dichos islotes la frecuencia de CpG es casi 5 veces más importante que en el resto del genoma, abarcando de entre 200 pares de bases a varias kilo-bases.

Si bien muchas CpG ubicadas en los islotes CpG se mantienen al margen del proceso de metilación; otras CpG sufren un proceso de metilación alélica diferencial, como ocurre durante la inactivación del cromosoma X en las mujeres y de aquellos genes de impronta génica, en los que sólo es necesaria la expresión del gen materno o paterno [193].

De esta manera, cada célula presenta un patrón de metilación específico de su ADN y sumamente controlado.

1.4.2 DNA metiltransferasas

Estas enzimas son las responsables de catalizar la transferencia del grupo metilo en la porción 5' del anillo de citosina. Se han identificado tres ADN metil transferasas involucradas en los procesos de metilación del ADN en mamíferos: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b [194].

En modelos animales, la DNMT1 es la responsable de mantener los patrones de metilación, mientras que DNMT3a y DNMT3b se encargan de la metilación de “ novo” [194, 195].

Hasta hace unos años se asoció la actividad de la DNMT1 como la única responsable del proceso de metilación en las células tumorales. Sin embargo, estudios posteriores en células de cáncer de colon demostraron que existe una potente interacción entre la DNMT1 y la DNMT3b [196].

Introducción

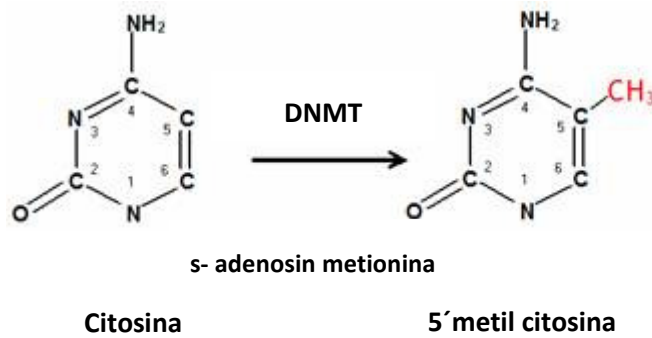


Figura 7: Metilación de la citosina. Tres ADN metil transferasas son las responsables de catalizar la adición del grupo metilo en la posición 5' del anillo de citosina, empleando a la S-adenosin metionina como donante de el grupo metilo

1.4.3 Proteínas que intervienen en la metilación y la represión de la transcripción

– Nucleosomas

Constituyen el epicentro de la regulación génica. Son estructuras conformadas por dos vueltas de ADN en torno a octámeros de histonas, constituido por dos subunidades de cada histona, H2A, H2B, H3 y H4. La histona H1 sirve de enlace y facilita la compactación del mismo. Los extremos N-terminales de las histonas sobresalen del nucleosoma, resultando trascendentales en la función regulatoria [197].

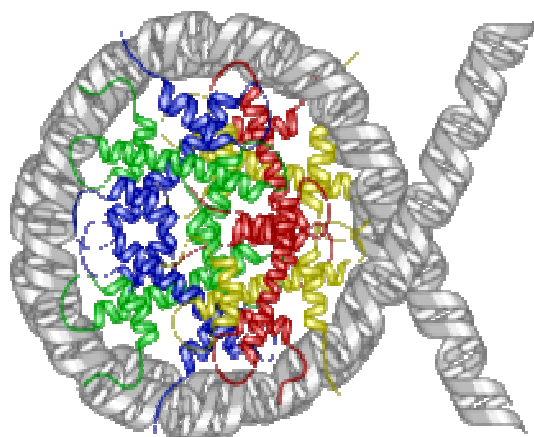


Figura 8: Estructura del nucleosoma. La hebra de ADN se envuelve 1.7 veces alrededor del octámero constituido por las histonas

– **Histonas y sus modificaciones post-traslacionales**

Los residuos N-terminales de las histonas sufren diversas modificaciones covalentes. Éstas comprenden acetilación de lisina, metilación de arginina o lisina, fosforilación de serina o treonina, ubiquitinización de lisina, somocilación de lisina y la ADP-ribosilación de ácido glutámico. Todas son reversibles a excepción de la metilación. Estas modificaciones post-transcripcionales son indispensables en la regulación de la transcripción génica. [198].

Algunas de estas modificaciones son necesarias para promover otra modificación. Esto sucede con la fosforilación de la serina 10 en la H3 que antecede a la acetilación en la lisina 14 y que en conjunto favorecen el inicio de la transcripción [197].

La acetilación de los residuos de lisina se asocia por lo general a la activación transcripcional. Las histonas acetil transferasas (HAT) son las responsables de dicha modificación. Existe un verdadero equilibrio entre la actividad de las histonas acetil transferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC) [199].

La metilación de ciertos residuos de lisina se asocia a mecanismos de inactivación génica, como ocurre con la lisina 9 y 27. Sin embargo, la metilación de los residuos de arginina de las histonas H3 y H4 está ligada a la activación transcripcional [197].

La ubiquitinación de los residuos de lisina cumple un rol importante en la regulación de la transcripción mediante la degradación de los factores transcripcionales en el proteasoma o mediante otros mecanismos que involucran a diferentes complejos [197].

La fosforilación de la serina 10 de la H3 se asocia a un incremento en la mitosis, condensación de los cromosomas y activación de transcripción génica [197].

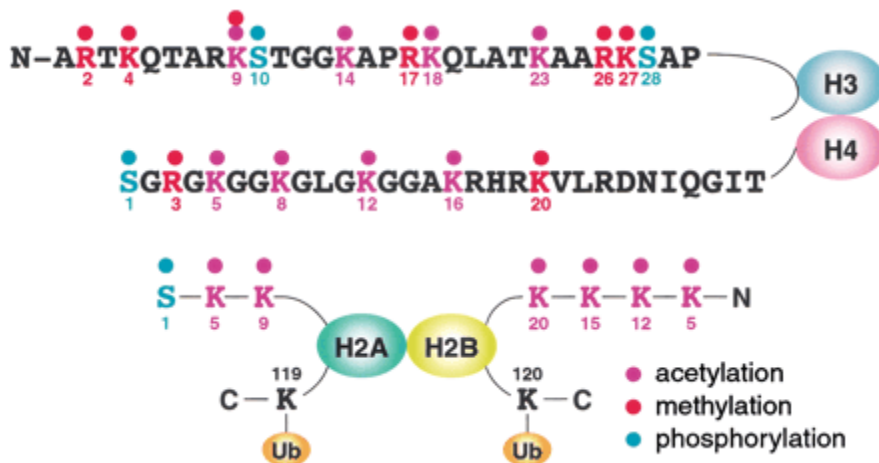


Figura 9: Sitios de modificaciones post transcripcionales de los residuos de histonas. Se muestra la acetilación en rosa, la metilación en rojo y la ubiquitinación en naranja [198]

– Proteínas de unión a metil citosina

La MeCP1 y MeCP2 fueron los primeros complejos de proteínas de unión a metil citosina que han sido estudiadas. MeCP2 posee dos dominios, un dominio de unión a la metil citosina o MBD y un dominio de represión de la transcripción o TRD, que permite inhibir la transcripción de un promotor a distancia [200].

Posteriormente se caracterizaron cinco miembros de una familia de proteínas de unión de la metil citosina entre las que se incluyen: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 y el complejo proteico Kaiso. MeCP1, MBD1, MBD2y MBD4 se unen al ADN metilado a través del dominio de unión a la a metil citosina (MBD) [201]. Mientras que Kaiso lo hace a través de un dominio de unión en dedos de zinc [202].

MBD4 se asocia a la reparación del ADN; mientras que las MBD otras reprimen la transcripción in vitro e in vivo al interactuar con los complejos de las histonas deacetilasas (HDAC1 y HDAC2) [183].

La mayor parte de nuestro genoma se encuentra empaquetado como una cromatina transcripcionalmente inactiva (heterocromatina pericentromérica). En estas regiones, la mayoría de las CpG están metiladas y se unen las proteínas de unión a metil citosina, conformando un complejo que incluye a otras proteínas como las histonas deacetilasas. Los residuos deacetilados de las histonas favorecen la

compactación del nucleosoma, bloqueando el acceso al complejo constituido por los factores de transcripción (factor de transcripción, histona acetil transferasa y coactivador de la transcripción)

Sólo una parte del genoma es transcripcionalmente activo y la cromatina debe responder a los diferentes requerimientos transcripcionales de la célula, manteniéndose un balance permanente entre la heterocromatina y la eucromatina.

1.4.4 ¿Cómo se regula de la expresión génica a través de la metilación?

La regulación de la expresión génica en las células eucariotas es un proceso algo complejo. La iniciación de la transcripción es un evento sumamente controlado, en el que intervienen factores que forman parte de la misma secuencia génica (Cis-acting elements) y que servirán de sustrato para la interacción con los factores de transcripción génica (Trans-acting elements).

Se han postulado dos posibles mecanismos a través de los cuales la metilación del ADN interferiría en el proceso transcripcional.

Por un lado, se propuso que la propia presencia del grupo metilo en la secuencia del ADN impedía estéricamente la unión de ciertos factores de transcripción. Varios factores de transcripción como AP-2, Cmyc/Myn, E2F y el NFkB, reconocen secuencias de unión al ADN que contienen CpG y la unión a ellas estaría inhibida por la metilación de estas CpG [203].

Como segundo argumento posible la metilación inhibiría al proceso transcripcional a través de la unión proteínas de unión a metil citosinas, quienes actuarían como verdaderos represores en la transcripción al unirse al ADN metilado e impedir la interacción con los factores de transcripción. Como se comentó con anterioridad, se conocen cinco proteínas de unión a metil citosina, cuatro de las cuales están implicadas en la represión transcripcional (MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3). MeCP2, MBD3 y MBD3 además son capaces de formar complejos con histonas deacetilasas, coadyuvando en la represión de la transcripción [203].

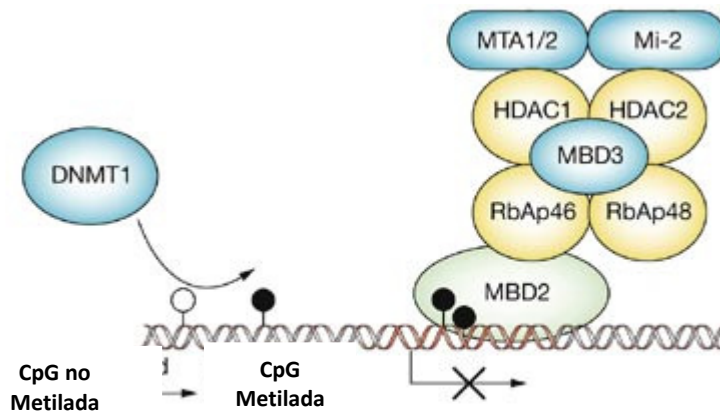


Figura 10: La DNMT cataliza la transferencia del grupo metilo en la posición 5' del anillo de citosina. La MBD2 se une a las CpG metiladas y media la represión transcripcional, constituyendo un complejo proteico conformado por varias proteínas entre las que se encuentran la HDAC 1 y 2

1.4.5 Metilación del ADN y carcinogénesis

En contraposición a lo que ocurre en las células normales, el patrón de metilación de las células tumorales sufre una importante alteración. Los distintos estudios desarrollados en este ámbito han permitido observar que existen dos hechos globales y contrapuestos; una hipometilación de las regiones pobres en CpG, que deberían permanecer metiladas [204] y una hipermetilación de los islotes CpG de la zona promotora.

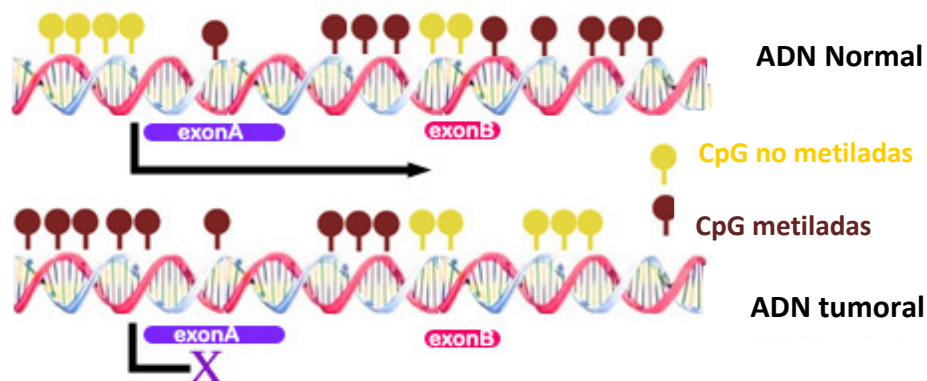


Figura 11: Las células tumorales se caracterizan por una hipermetilación de los islotes CpG y una hipometilación generalizada del ADN.

– **Hipometilación global del genoma**

El mecanismo por el cual se sucede esta hipometilación generalizada es poco conocido. Se ha propuesto varias hipótesis para tratar de explicar este evento. Algunos sostienen que una dieta pobre en folatos o alteraciones en el metabolismo de éste podrían asociarse a un incremento en la hipometilación y un incremento en presencia de daños en el ADN [205]. También podría deberse a un desbalance en las enzimas de que participan del mantenimiento de la metilación.

La hipometilación contribuye en el desarrollo del proceso tumoral mediante la activación de oncogenes, factores de crecimiento y genes involucrados en los procesos de proliferación celular, invasión y metástasis [206]. La expresión de numerosos genes tumorales como PLAU (urokinase type plasminogen activator), heparanasas, y proteínas de unión al calcio se inducen vía hipometilación. En su conjunto estas proteínas favorecen el movimiento de las células tumorales a través de la matriz extracelular hacia el torrente sanguíneo y las vías linfáticas. Otro ejemplo de la implicancia de la hipometilación y la proliferación celular tumoral es el caso de factor de crecimiento insulínico (IGF1), regulado en células normales por impronta génica. En las células tumorales, se induce la expresión bialélica de dicho gen y se promueve la proliferación tumoral [166].

La hipometilación de los trasposones también contribuye en el proceso carcinogénico al incrementar la inestabilidad génica. Las secuencias LINES (Long Interspersed Nuclear Elements) se encuentran metiladas en las células normales. Su hipometilación induce la expresión de las secuencias traspósónicas y contribuye a la inestabilidad genética y la progresión tumoral. La hipometilación de estas secuencias se ha observado en cáncer de colon y leucemia linfocítica crónica, contribuyendo al desarrollo del fenotipo maligno [207].

– **Hipermetilación de los islotes CpG de la zona promotora**

En el contexto de esta hipometilación generalizada, las células tumorales sufren concomitantemente un incremento de la metilación en la zona promotora de genes constitutivos y de genes supresores de tumor. Esta modificación epigenética constituye un mecanismo adicional para alcanzar el silenciamiento alélico de un gen supresor de tumor, al igual que las mutaciones o deleciones genéticas [208].

Según la hipótesis de Knudson para que se produzca la inactivación de un gen supresor de tumor es preciso la pérdida de ambas copias alélicas [209]. Durante el proceso oncogénico, una de esas copias puede perderse como consecuencia de una mutación germinal o somática, seguida de la pérdida del otro alelo a causa de una deleción o la pérdida de heterocigosidad. En las células tumorales la hipermetilación de la zona promotora puede ser el primer paso en el proceso de inactivación de un gen, con la consecuente pérdida del alelo restante por una mutación o deleción. Incluso se ha evidenciado la pérdida de ambos alelos debido a la hipermetilación del promotor en los tumores no familiares. En los tumores de origen familiar, la hipermetilación constituye el segundo paso en la pérdida de expresión de un alelo [210].

La hipermetilación es un evento frecuente en el desarrollo y la progresión tumoral, quizás tan frecuente como las mutaciones [211]. Muchos de los genes implicados en este proceso actúan como reguladores del ciclo celular, en la diferenciación, transducción de señales, reparación del ADN, metástasis y angiogénesis.

A continuación se muestran algunos de los genes frecuentemente metilados en distintos tumores y su función en el desarrollo del fenotipo tumoral [203].

Gen	Función en el desarrollo tumoral	Tipo tumoral
APC	Regulación de la proliferación, migración y adhesión celular. Reorganización del citoesqueleto y estabilidad cromosómica	Mama, pulmón, esófago
BRCA	Reparación del ADN y activación de la transcripción	Mama, ovario

Introducción

CDKN2A/p16	Inhibidor de las ciclinas dependiente de quinasas	GIT, cabeza y cuello, linfoma de Hodgkins
DAPK1	Supresión de la apoptosis	Pulmón
E-caderina	Aumenta la proliferación invasión celular y favorece la metástasis	Mama, tiroides, gástrico
ER	Resistencia hormonal	Mama, próstata
GSTP1	Disminuye la detoxificación de metabolitos	Próstata, mama, renal
hMLH1	Defectos en la reparación del ADN y de mutaciones	Colon, gástrico, endometrio, ovario
MGMT	Se asocia a p53 en la reparación del daño celular y resistencia a drogas	Pulmón, cerebro
p15	Activación y proliferación celular	Leucemia, linfoma, pulmón
RASSF1A	Pérdida del control de la regulación del ciclo celular	Pulmón, mama, ovario, riñón
RB	Fallo en la inhibición de la transcripción de los genes necesarios para la replicación y división celular	Retinoblastoma, oligodendroglioma
VHL	Alteración de la estabilidad del ARN a través de la degradación de proteínas de unión al ARN	Células renales

Algunos de ellos, como RASSF1A y P16, se encuentran habitualmente metilados en gran variedad de tumores mientras que otros solo parecen asociarse a determinados tipos tumorales. Un ejemplo de ello es el gen GSTP1 que se encuentra metilado en más del 90% de cáncer de próstata; pero está no metilado en la leucemia mieloide aguda [212]. El mecanismo por el cual ciertos genes se inactivan por metilación en determinados tipos tumorales, mientras que en otros permanecen inalterados todavía no está claro.

Se han postulado posibles respuestas a este interrogante. Si en las células tumorales se produce un desbalance entre la metilación y la maquinaria que protege a las células de este proceso, podríamos esperar un perfil de metilación al azar y no un perfil específico de cada tipo tumoral. Por otra parte, también es posible que surjan subgrupos específicos de activen a las ADN metil transferasas o sus cofactores con secuencia específica, aunque todavía no se hallan identificado ADN metil transferasas de secuencia específica. Otra posible explicación podría ser que la falta de regulación o

el silenciamiento de determinados genes en distintos tipos celulares, las hace más susceptibles al proceso de metilación de “novo” especialmente en las células tumorales en las cuales existe una elevada actividad de las ADN metil transferasas [213].

1.4.6 Deacetilación de las histonas y carcinogénesis

Es poco lo que se conocía hasta el momento sobre el perfil de las modificaciones transcripcionales de las histonas y su influencia en la en el proceso carcinogénico.

Como ya se comentó con anterioridad, la hipermetilación de los islotes CpG de muchos genes tumorales se asocian a la presencia de cambios específicos en los residuos de determinadas histonas. Por lo general, se observa una deacetilación de las H3 y H4, pérdida de la metilación de los residuos de lisina 4 de la H3 y ganancia de metilación de la lisina 9 y 27 de la H3. Estos cambios ocurren de manera progresiva y acumulativa durante el desarrollo tumoral [198].

En leucemias y sarcomas se observó la presencia traslocaciones de genes involucrados en la metilación y la acetilación de las histonas con la consecuente aparición de proteínas de fusión aberrantes. En tumores sólidos se observó la sobreexpresión de los genes que codifican para las histonas metil transferasas o de histonas deacetilasas [214].

1.4.7 Hipermetilación de microRNA

Los microRNA son secuencias cortas de 22 nucleótidos que regulan la expresión, mediante su unión a ARN mensajero de secuencia específica. Como consecuencia de esta unión, se produce una degradación o inhibición de la traslación. Cada vez son más los genes cuya expresión se regula mediante la actividad de los microRNA.

Estudios recientes demostraron que existe diferencia en el patrón de expresión de los microRNA entre tejidos normales y tejidos tumorales [215]. La pérdida de expresión de algunos de estos microRNA, como es el caso de Let 7 y MiR-15/MiR16 que se unen a los oncogenes RAS y Bcl-2 respectivamente, resulta en un incremento de

la expresión de estos últimos.

La inactivación de estos microRNA por metilación de la zona promotora es un evento común en diversos tumores. En estudios desarrollados con líneas tumorales de cáncer de colon la pérdida de miR-124a por metilación conlleva a un incremento de la activación del oncogén CDK6. En este mismo estudio se evidenció que las líneas celulares sin expresión de DNA metiltransferasas no presentaban alteración de la expresión miR-124a [216].

La desregulación de la expresión de los microRNA mediante hipermetilación constituye una nueva e interesante área de estudio, que podría resultar de gran implicancia en el tratamiento de los pacientes con agentes demetilantes.

1.4.8 Análisis de la metilación del ADN

La distribución de los residuos de CpG metiladas en una muestra de ADN que proviene de un tejido es bastante compleja y heterogénea. Los patrones de distribución puede ser analizada de diferentes formas.

A pesar de que el estudio del contenido global de la metilación del ADN puede ser importante por el rol que desempeña en el desarrollo tumoral, los datos obtenidos de su análisis resultan escasos para ser empleados como marcador molecular. Por el contrario, la investigación de los niveles de metilación de cada CpG puede dar una información más útil si se intenta evaluar cualitativamente la regulación de determinadas secuencias.

El análisis de los patrones de metilación mediante técnicas de secuenciación previa modificación con bisulfito (BS-MS-PCR) permite obtener una secuencia detallada del estado de metilación de las CpG en una zona en particular del genoma [217], mientras que a través de la PCR específica para metilación (MS-PCR) se puede obtener un patrón altamente sensible y específico del estado de metilación del ADN [184]. Estos patrones de metilación permiten obtener un estatus de metilación en posiciones puntuales del genoma, ya sea a través del análisis de CpG individuales, análisis con enzimas de restricción o análisis de microarreglos de ADN [218], o de múltiples CpG dentro del genoma [219].

Algunas de estas técnicas se describen en el esquema a continuación.



Técnicas empleadas para la detección de patrones de metilación

Con el empleo las primeras enzimas de restricción en conjunto con las técnicas de southern hybridization, se llevaron a cabo los primeros análisis del estado de metilación de determinados genes.

Sin embargo, fue con la introducción de la conversión de ADN genómico con bisulfito de sodio que se produjo una verdadera revolución en este ámbito. Esta modificación química, inicialmente descrita por Shapiro y colaboradores en 1970, se basa en la diferente sensibilidad entre las citosinas y la metil citosinas a sufrir en primera instancia una deaminación en condiciones ácidas en presencia de bisulfito. Finalmente, las citosinas son transformadas en medio básico en uracilo mientras que las metil citosinas permanecen como tal [220].

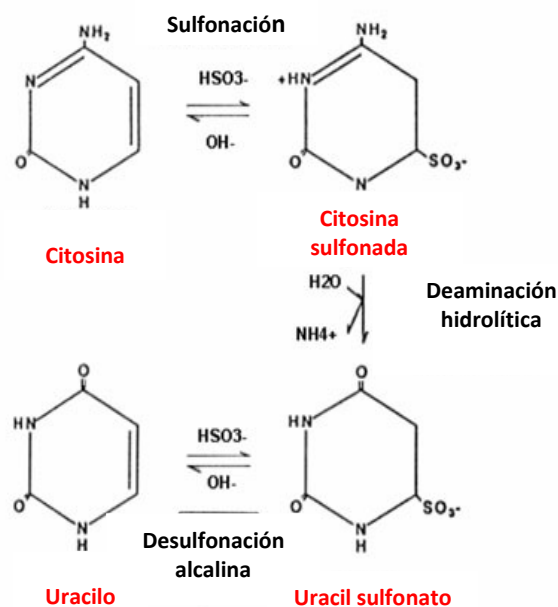


Figura 12: Reacción de modificación con bisulfito de sodio. Conversión de la citosina no metilada a uracilo en presencia del bisulfito de sodio

Su empleo recién se difundió tras publicarse su eficacia en términos de conversión y su utilidad en conjunto con otras técnicas, como PCR y secuenciación [217]. A partir de entonces, son muchas las técnicas que se basan en la eficacia de esta modificación química con bisulfito. Ninguna de estas técnicas resulta superior en términos de precisión, sensibilidad, compatibilidad para el análisis de tejido parafinado o posibilidad de automatización. Por lo que la elección de la técnica a emplear dependerá de su aplicación.

La amplificación de la secuencia de ADN modificado requiere considerar tres factores para el diseño de los cebadores correspondientes.

- La nueva secuencia modificada ya no resulta complementaria. Por lo que los cebadores deben ser diseñados para amplificar la hebra superior e inferior.
- Los cebadores deberán incluir varias citosinas que no forman parte de los islotes CpG, y que se convierten en uracilo tras la modificación con

bisulfito. De esta manera se evita la amplificación de secuencias residuales de ADN que no sufrieron el proceso de modificación.

- La variación de la secuencia que refleja el estado de metilación de los dinucleótidos CpG en el ADN original puede ser determinado mediante dos enfoques diferentes en el diseño de los cebadores. Por un lado, se pueden diseñar de tal manera que no cubran los dinucleótidos CpG, sino que se obtenga un producto de PCR con las potenciales secuencias metiladas situadas entre los cebadores. Este tipo de diseño se emplea en técnicas como la secuenciación con bisulfito, COBRA y Ms-SNuPE. [217, 221, 222]. La otra alternativa es amplificar la secuencia de ADN modificada con bisulfito con cebadores diseñados para que unan específicamente a la secuencia metilada y no metilada de la secuencia. Este último enfoque constituye la base de la MS-PCR [184].

MS-PCR

La MS-PCR es la técnica más empleada para el estudio de los patrones de metilación de los islotes CpG, razón por la cual merece un especial comentario.

Como se explicó anteriormente, la base de la misma está establecida por la diferencia entre los alelos metilados y no metilados. El diseño de los cebadores es por tanto fundamental. Al llevar a cabo el mismo será necesario tener en cuenta los siguientes factores: la temperatura de anealing de los cebadores debe ser similar y estar comprendida entre los 55°C y 66°C, el amplicon resultante no debe exceder los 175 pb, cada cebador debe contener al menos dos CpG en su secuencia y en la caso del cebador en sentido deberán estar ubicadas en la porción 3'. La elevada sensibilidad de este método permite el análisis de pequeñas muestras de ADN, incluso de de tejido parafinado [184].

No obstante, la resolución a nivel de nucleótidos requiere de una secuenciación del producto de PCR y no es posible obtener datos cuantitativos o referentes a la heterogeneidad de las poblaciones celulares.

Introducción

Con la finalidad de solucionar estos inconvenientes, se realizaron modificaciones de esta técnica.

- √ Combinación de MS-PCR con hibridización in situ: permite la visualización del estado de metilación de determinadas secuencias de ADN en células individuales, lo que facilita el análisis de muestras que contienen una miscelánea de tejido tumoral y normal [223].
- √ MS-PCR y DHPLC: para muestras que contienen un mosaicismo marcado de células normales y tumorales. El producto de PCR se puede identificar mediante HPLC desnaturalizante [224].
- √ MethyLight: emplea tecnología de PCR cuantitativa y no requiere de pasos adicionales. El ADN modificado con bisulfito es amplificado mediante PCR cuantitativa en tiempo real, mediante la utilización de cebadores que flaquean una sonda marcada con fluorescencia. La fluorescencia que es proporcional al producto de PCR y el grado de ADN metilado puede ser detectado secuencialmente. La elevada sensibilidad permite comparar muestras de tejidos normales con muy bajos niveles de metilación con muestras de tumores, en las que los niveles de metilación son significativamente más importantes [225].

1.4.9 Aplicaciones clínicas

– Detección y pronóstico

La metilación de novo ocurre tempranamente durante la carcinogénesis e incluso puede ser detectada en el epitelio normal de algunos pacientes, asociada al envejecimiento y los procesos inflamatorio. Los alelos metilados pueden ser detectados con un alto grado de sensibilidad, por lo que el estudio de los mismos podría transformarse en un posible método de detección precoz de la patología tumoral.

Es posible detectar el estado de metilación de múltiples genes en muestras de diferentes fluidos biológicos, como plasma, esputo y orina, de pacientes con cáncer. Los resultados obtenidos de estos estudios indican importantes adelantos en el hallazgo de marcadores para el diagnóstico de la patología [226]. Sin embargo, todavía es necesario estudiar más a fondo dichas alteraciones con el fin de esclarecer si son en realidad marcadores de riesgo o de diagnóstico, ya que en muchos casos estas alteraciones

aparecen en epitelio no tumoral. Otro problema a resolver es la frecuencia de metilación de los distintos genes en los diferentes tipos tumorales, por lo que la implementación de un pequeño panel de biomarcadores de metilación ha sido propuesta para intentar subsanar este inconveniente [227].

También es posible hallar una asociación entre la metilación de determinados genes y la progresión de la patología en distintos tipos de cáncer, así como también la presencia de metástasis y el incremento de la angiogénesis [228-230].

– *Respuesta al tratamiento*

El análisis de biomarcadores que podrían predecir una respuesta a determinada terapia está todavía en vías de desarrollo. En algunos estudios se establece una asociación entre la metilación de determinados genes y la respuesta a la quimioterapia, como es el caso de MGMT en tumores cerebrales y el tratamiento con agentes alquilantes [231, 232]. Sin embargo se requieren de más estudios prospectivos aleatorizados en los que se pueda analizar la asociación de estos posibles marcadores de respuesta a la quimioterapia.

– *Reactivación de genes silenciados*

La metilación es un proceso potencialmente reversible y que ocurre casi preferencialmente en las células tumorales. Estas ventajas pueden utilizarse en el diseño de fármacos que inhiban dicho mecanismo y por tanto ayuden no sólo al tratamiento, sino también a la prevención, considerando que los mismos se desencadenan tempranamente durante la carcinogénesis.

Los primeros agentes demetilantes, la 5'azacitidina y su derivado 5'aza-2'deoxicitidina, se sintetizaron hace más de 20 años como agentes antineoplásicos [233].

Con posterioridad se observó que una vez metabolizadas, se incorporan al ADN en el lugar de la citosina. Debido a la sustitución del átomo de nitrógeno en posición 5' por un carbono en la hebra de ADN, se inhibe el proceso de metilación, resultando en un ADN hemimetilado. En una segunda etapa de síntesis, la presencia de estos análogos da lugar a la síntesis de un ADN completamente demetilado[234].

A elevadas dosis provocan una mielodepresión importante, siendo éste el principal efecto adverso de su empleo. La utilización de bajas dosis para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos permitió obtener buenas respuestas con baja toxicidad

[235].

También se han desarrollado inhibidores de las histonas deacetilasas que empleados en conjunto con otros inhibidores de la metilación han demostrado ser sinérgicos en el tratamiento de leucemias y tumores sólidos [236].

1.5 HIPERMETILACIÓN DE *CHFR* (CHECKPOINT WITH FORK HEAD-ASSOCIATED AND RING FINGER DOMAIN)

1.5.1 Control de mitosis

Antes de pasar a mitosis, las células animales deben duplicar sus cromosomas y formar el huso mitótico. Una maquinaria constituida por microtúbulos en torno a centrómeros, que se encargaran de transportar los cromosomas a las dos células hijas. Durante este proceso se suceden una serie de cambios morfológicos y moleculares que permiten distinguir diferentes estadios.

En la profase, los cromosomas comienzan a condensarse y la membrana nuclear se rompe. Durante la prometafase se desencadena una increíble reorganización del citoesqueleto, formándose el huso mitótico al que se unirá cada par de cromosomas duplicados. Luego en la metafase, los cromosomas se unen a los microtúbulos a través de sus kinetocoros y se alinean en el plano entre los polos del huso mitótico. La segregación de los dos juegos de cromosomas sucede durante la anafase tras la pérdida de la unión de la cromátides hermanas. Finalmente, en la telofase los cromosomas se descondensan y tras la aparición de la envoltura nuclear aparecen dos nuevos núcleos. Una vez que los dos núcleos se separan, las células entran en citoquinesis para dividir el citoplasma y permitir la separación de las nuevas células formadas.

Este proceso se regula en distintos puntos:

- En caso de que se produzca un daño celular, existe un punto de control en G2 que impide el paso a mitosis hasta que dicho daño esté reparado. Proteínas sensoras, como ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 Related*), al detectar el daño en el ADN desencadenan la activación de señales intracelulares en las que intervienen diversas proteínas y quinasas [237].

- Uno de los más descritos es aquel que impide la separación de los cromosomas y el ingreso a metafase hasta que los kinetocoros se encuentren correctamente unidos al huso mitótico, conocido como SAC (*mitotic assembly checkpoint*). Las señales inhibitorias se activan al producirse una falla en la unión de los cromosomas a sus kinetocoros y desencadenan la activación de diversas proteínas como

Introducción

MAD 2, BUBR1, BUB3 y TTK. El complejo proteico formado por Aurora B, Survivin e INCENP sería el responsable de mediar la activación de este punto de control. BUBR1 se activa y retiene en colaboración con otras proteínas al heterodímero conformado por MAD1-MAD2. De esta manera se mantiene secuestrada a CDC20 impidiendo la activación del APC/C. Una vez que los cromosomas se alinean correctamente, MAD2 se libera del complejo y se favorece la activación de APC/C-CDC20, que degradan a PTTG1 y a CiclinaB1. Tras la degradación de PTTG1 se favorece la activación de una separasa que rompe la unión que mantiene unidas a las cromátides hermanas. Con la degradación de la Ciclina B1 se inactiva a CDK1, necesaria para salir de la mitosis [237].

– En levaduras se han descrito otros dos puntos de control. Uno de ellos mediado por EB1, una proteína que se activa cuando existe una orientación incorrecta del huso mitótico, evitando el paso a la telofase. El otro punto de control es conocido como la vía de *NoCut*. Aurora B y Boi1 y 2 son los responsables de provocar un retraso en la citoquinesis cuando hay defectos en la zona media del huso mitótico [237].

– Scolnick y Halazonetis en el año 2000 describieron un nuevo punto de control, que regula el paso a metafase. En respuesta al daño provocado por los agentes antimicrotúbulos, **CHFR** (Checkpoint with FHA and Ring domain) aplaza la condensación de los cromosomas [238].

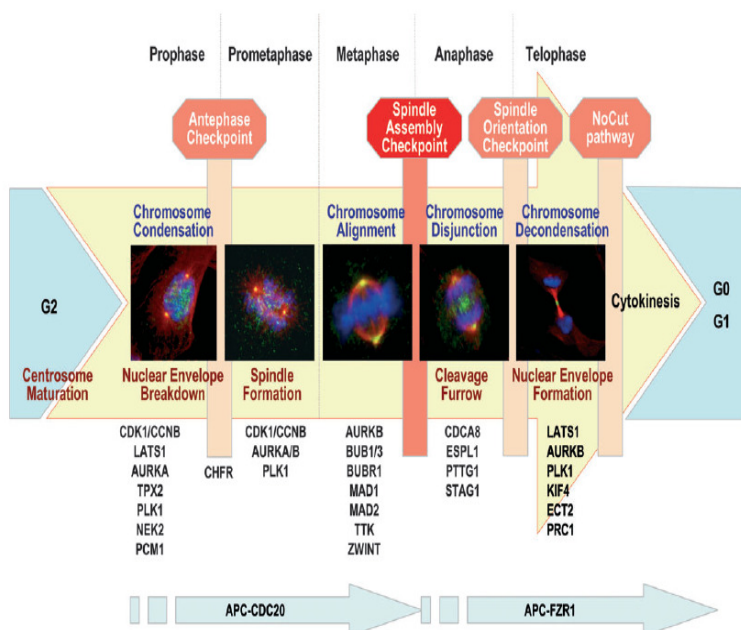


Figura 13: Cambios celulares y moleculares que se suceden durante la mitosis. Se observan los mayores cambios en los cromosomas y el huso mitótico, así como los distintos puntos de control. DNA teñido con 4'6'diamino2fenilindol (azul); microtúbulos (rojo) y PLK en verde detectados mediante el uso de anticuerpos específicos [237]

1.5.2 Agentes antimicrotúbulos y control del estrés mitótico

Los microtúbulos están compuestos por subunidades de dímeros de α y β tubulina. Los monómeros de tubulina se ensamblan como protofilamentos lineales para constituir los microtúbulos. Cada microtúbulo se compone de entre 9 a 13 protofilamentos lineales y forman una especie de pared en torno a un eje central. Debido a que los protofilamentos del microtúbulo se alinean de manera paralela, los microtúbulos tienen una polaridad diferente.

El crecimiento de los microtúbulos está mediado por un mecanismo de nucleación-elongación. Uno de los extremos del microtúbulo (plus end) es más dinámico que el otro (minus end). El movimiento de los microtúbulos está regido por dos procesos principales. El primero conocido como “treadmilling”, que consiste en el crecimiento en uno de los extremos y la reducción en el extremo opuesto. El segundo movimiento es el de “inestabilidad dinámica”. Es un proceso en el que los extremos de los microtúbulos cambian espontáneamente entre el crecimiento lento sostenido y el rápido acortamiento.

Muchas sustancias de origen natural y sintético pueden perturbar su integridad, entre las que se incluyen los Vinca alcaloides y los taxanos. Los taxanos estabilizarían los microtúbulos mediante el fortalecimiento de las interacciones laterales entre los protofilamentos de tubulina, provocando una alteración en la constante de disociación de la tubulina en ambos extremos de los microtúbulos. Esto induciría una supresión de los movimientos de los microtúbulos, que son esenciales para el mantenimiento de su dinámica y una parada en la metafase/anafase del ciclo celular.

El mecanismo exacto por el cual la detención del ciclo celular desencadena la muerte celular, no está del todo esclarecido. Los taxanos inducirían la apoptosis a través de la activación de las caspasas 3 y 8 o de un proceso conocido como “muerte lenta” en el que no participan las vías apoptóticas.

La observación de una marcada diferencia entre células normales y de algunas células tumorales en el ciclo celular al ser tratadas con agentes antimicrotúbulos permitió vislumbrar la existencia de un nuevo punto de control en el ciclo celular [239].

Introducción

Scolnick y Halazonetis trataron de identificar nuevas proteínas con dominios forkhead-associated (FHA), que normalmente se asocian a factores de transcripción, proteínas quinasa y proteínas de control del ciclo celular [238].

Se identificó a *CHFR* como el gen responsable de desencadenar la detención en la profase del ciclo celular ante el daño provocado por los agentes antimicrotúbulos. Scolnick y Halazonetis estudiaron ocho líneas tumorales y encontraron que este control no funcionaba en cuatro de ellas. Tres de estas líneas celulares no expresaban *CHFR*. Mientras que las células normales y tumorales que expresaban *CHFR* mostraban un retraso en el paso a la metafase cuando eran sometidas al stress mitótico, las células tumorales que no expresaban dicho gen mostraban una continuidad en su ciclo celular. La re-expresión de dicho gen reintegraba este punto de control y permitía que estas células sobrevivieran al estrés provocado por los agentes antimicrotúbulos [238].

1.5.3 Caracterización y función biológica de *CHFR*

La proteína identificada presenta un amino terminal con un dominio forkhead-associated (FHA), una región central con un dominio ring finger (RF) y un carboxilo terminal rico en residuos cisteína (CR), que no presenta similitud con ninguna otra proteína del Genbank; pero altamente conservada en humanos y ratones. Debido a su papel en el control de ciclo celular y a sus dominios bien caracterizados, esta nueva proteína recibió el nombre de *CHFR* (*checkpoint with FHA and ring finger domain*). Es miembro de una pequeña familia de proteínas con dominios FHA y RF [238].

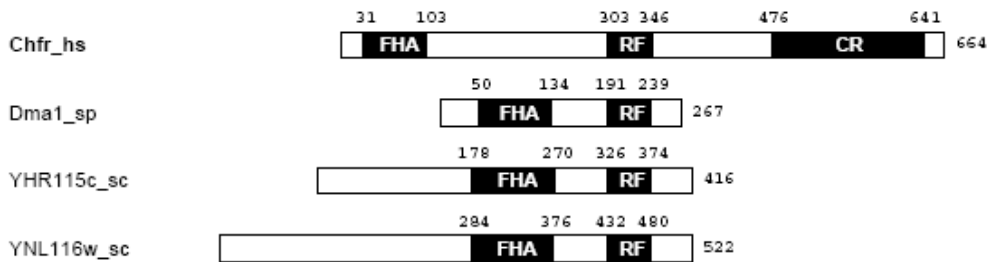


Figura 14: Familia de proteínas con dominios FHA y RF. FHA: Forkhead-associated; RF: ring finger; CR: residuos cisteína [238]

Introducción

Los dominios FHA son capaces de reconocer e interactuar con fosfoproteínas [240]. Stavridi y colaboradores estudiaron la estructura cristalina del dominio FHA de *CHFR*. Éste cristaliza como un dímero. Cada subunidad consiste en 10 hojas β y una α hélice corta entre dos hojas de la porción carboxilo. Cada dominio del dímero está formado por dos segmentos que se intercambian, cada uno derivado de una molécula diferente. El primer segmento forma la porción amino terminal de las 6 primeras hojas β y la mitad del amino terminal de la séptima hoja, y el segundo segmento la porción carboxilo terminal de la séptima hoja y el carboxilo terminal de las tres hojas restantes y la α hélice. Esta estructura presenta gran homología con el dominio FHA de Rad 53, la única diferencia radica en que el dominio FHA de Rad 53 es monomérico [241].

In vitro, el dominio FHA de *CHFR* es capaz de unirse al tungstato. El tungstato tiene una geometría molecular y una carga similar a los grupos fosfatos, razón por la que se lo emplea como un análogo de éstos en los estudios de cristalización. Esta avidez por el tungstato *in vitro* supone que *in vivo*, el dominio FHA de *CHFR* es capaz de unirse a proteínas fosforiladas. Si bien hasta el momento no se conoce la naturaleza de estas proteínas, podría tratarse de proteínas que intervienen en el control de ciclo celular y que se activarían en respuesta del stress mitótico [241].

Molecularmente hablando, existe una diferencia entre la porción amino terminal del dominio FHA de *CHFR* y de Rad 53. El dominio FHA de *CHFR* presenta un grupo de residuos polares, adyacente a los residuos de unión a los ligandos, que se encuentran conservados en los dominios FHA de proteínas de control del ciclo celular pero no en factores de transcripción. A partir de entonces se dividieron de los dominios FHA en distintos grupos de acuerdo a la naturaleza de los ligandos [241].

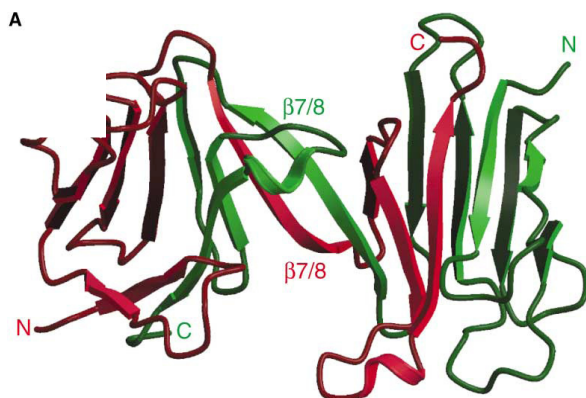


Figura 15: Estructura del dominio FHA de *CHFR*. Se muestra la estructura de los segmentos que constituyen el dímero. Las cadenas de los dos polipéptidos se muestran en rojo y verde respectivamente. N: amino terminal y C carboxilo terminal [241]

Introducción

La presencia de dominios RF en proteínas se asocia a actividad ubiquitina ligasa. La degradación de proteínas vía ubiquitinización implica la actividad en cascada de tres enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora (E2) y una ubiquitina ligasa (E3). En esta vía, la actividad de la ubiquitina ligasa (E3) es crítica, al vincular a la enzima conjugadora con los sustratos correspondientes. Mediante la vía de ubiquitinización canónica, la ubiquitina ligasa se encarga catalizar la formación de cadenas de poliubiquitina en las que el carboxilo terminal de una molécula de ubiquitina se une a otra molécula de ubiquitina a través de una unión isopeptídica en los residuos de lisina de la posición 48. De esta manera se señala a las proteínas para ser rápida e irreversiblemente degradadas en el proteasoma. La ubiquitina presenta otros seis residuos de lisina, cuatro de los cuales (6, 11, 29 y 63) pueden participar en la formación de la cadena de poliubiquitina. Otras ubiquitina ligasa se comportan de una manera no canónica, ya sea por la formación de monoubiquitina o la de cadenas de poliubiquitinas unidas a través de residuos de lisina de la posición 6 o 63, evitando degradación proteolítica y favoreciendo cambios en la actividad de la proteína, la localización subcelular o en la interacción proteína-proteína [242]. El prototipo de ubiquitina ligasa es el oncogén c-Cbl, que favorece la degradación de receptores con dominios tirosina quinasa. En ausencia de sustratos, el dominio RF es capaz de autoubiquitinizarse [243].

La caracterización de *CHFR* por parte de Chaturvedi y colaboradores permitió confirmar que *CHFR* actúa como ubiquitina ligasa capaz de catalizar su propia degradación en ausencia de sustratos y que dicha función depende de la integridad de dominio RF [244]. Estudios posteriores demostraron que el dominio RF de *CHFR* es esencial para la actividad ubiquitina ligasa de *CHFR* tanto *in vitro* como en extractos de *Xenopus*, pero que dicha función está, en cierta manera, regulada por el dominio FHA de la porción amino terminal de la proteína. El dominio RF de *CHFR* (*in vitro*) es capaz de ubiquitinar y degradar a Plk1 (Polo Like Kinase-1), provocando la inhibición en el paso a mitosis para permitir la reparación en los defectos en la estructura de los cromosomas [245]. La expresión de Plk1 está regulada en las células de los mamíferos. Comienza a acumularse durante la fase G2 y llega a su pico máximo en la mitosis. Plk1 regula a la quinasa Wee1 y a la fosfatasa Cdc25, que controlan la actividad de la quinasa Cdc2 en la transición de la G2 a mitosis del ciclo celular.

Introducción

Summers y colaboradores propusieron que el mecanismo por el cual *CHFR* induce la detención del ciclo celular en líneas celulares estaría mediado por la retención de la Ciclina B1 en el citoplasma. Elevados niveles de Ciclina B1 en el núcleo permite la activación del complejo Ciclina B1/Cdc2 y favorece la activación de Cdc25C. Como no se observó ningún cambio directo en los niveles o la migración de la Ciclina B1, se propuso que *CHFR* regularía los niveles de dicha ciclina de manera indirecta. La fosforilación de la Ciclina B1 favorece su exportación y acumulación en el núcleo, pero ni Plk1 ni Aurora A que median dicha fosforilación presentan alteraciones en sus niveles [246]. Si embargo, estudios posteriores demostraron que *CHFR* funciona como un gen supresor de tumor tanto *in vitro* como *in vivo*. Regula los niveles de expresión de Aurora A y Plk1 y contribuye a mantener la estabilidad genómica [247].

Investigaciones en líneas celulares proponen que *in vivo* *CHFR* podría comportarse como una ubiquitina ligasa no canónica. Es decir que *CHFR* favorece la formación de cadenas de poliubiquitina ligadas por uniones de lisina 63 empleando a Ubc13-Mms2 como enzima conjugadora. Además, *CHFR* requiere de Ubc13 para autoubiquitinizarse [248]. En lugar de favorecer la degradación en el proteasoma, *CHFR* conduciría la señalización de proteínas que participan del stress celular [249]. *CHFR* activaría a la quinasa p38 α , que fosforila e inactiva a la fosfatasa Cdc25b provocando una detención en el ciclo celular. Si bien todavía no está esclarecido el mecanismo por el cual *CHFR* desencadena la activación de esta quinasa, se propuso que interactuaría a través de su dominio RF con otra ubiquitina ligasa, favoreciendo la activación de la quinasa TAK1 que pertenece a la vía de activación de p38 α [248].

El hecho de desempeñar esta doble función, autoubiquitinizarse y ubiquitinar a otros sustratos, puede ser explicado mediante dos mecanismos regulatorios posibles. Por un lado, la actividad de autoubiquitinización puede entenderse de una manera separada de la actividad ligasa hacia distintos sustratos, siendo éstas mutuamente exclusivas, como ocurre con MDM2. Por otra parte, *CHFR* podría autoubiquitinizarse y ubiquitinar a otros sustratos, permitiendo la propia degradación y la de los sustratos de manera simultánea, mecanismo establecido para c-Cbl. Sin embargo, estos mecanismos no están esclarecidos para *CHFR* [245].

En resumen, *CHFR* cumple una importante función como gen supresor de tumor. A pesar de que son numerosos son mecanismos moleculares propuestos para

explicar su funcionamiento ninguno de ellos resulta ser superior. Hasta el momento tanto el dominio FHA como el RF han demostrado ser indispensables para cumplir su función en el control del ciclo celular.

1.5.4 Regulación y localización de *CHFR* durante el ciclo celular.

A pesar de las implicancias de *CHFR* en los procesos tumorales muy poco se conoce acerca de su regulación y localización durante el ciclo celular. Los primeros estudios llevados a cabo por Chaturvedi y colaboradores demostraron que *CHFR* se expresa a niveles muy bajos durante la fase G1 y luego sufre un incremento durante la fase S tardía; coincidiendo este patrón de expresión con el rol que desempeña en el control del ciclo celular. Los niveles de *CHFR* durante el ciclo celular serían regulados mediante la autoubiquitinización ya que tras la delección del dominio RF de *CHFR* su patrón de expresión no sufre cambios durante el ciclo celular [244].

Con respecto a su actividad de autoubiquitinización, estudios recientes demostraron que *CHFR* es capaz de unirse específicamente a través de dominio RF a la ubiquitina proteasa USP7. Esta proteína es miembro de la familia de proteínas que clivan las cadenas de poliubiquitina o a los precursores. Esta unión favorece la estabilización de *CHFR* y más aún, sirve para eliminar los residuos de ubiquitina producto de la autoubiquitinización de *CHFR* tanto *in vitro* como *in vivo*, participando de la regulación de *CHFR* [250].

Se observó que la distribución nuclear y la movilidad de *CHFR* dependen de su movimiento a través de los cuerpos de *PML*. Los focos nucleares que contienen a la proteína de leucemia promielocítica y que conforman los conocidos cuerpos *PML* cumplen un papel importante en la supresión de tumores. Estas estructuras se asocian a diversas moléculas como factores pro-apoptóticos y proteínas supresoras de tumor y podrían funcionar como sitios de almacenamiento o modificaciones de diversas proteínas. Según parece, existe un permanente intercambio entre el pool de *CHFR* presente los cuerpos de *PML* y los distintos sitios intracelulares, y este movimiento sería indispensable para que *CHFR* cumpla con su función en la regulación de ciclo

celular. La alteración en el dominio FHA o la presencia de células *PML*^{-/-} no sólo altera la dinámica y la distribución de *CHFR*, sino que también desencadena el fallo en el control de ciclo celular ante el estrés provocado por los agentes antimicrotúbulos [251].

Estos estudios se han realizado empleando la sobre-expresión de *CHFR* y no existen mucha información sobre lo que ocurre en la regulación endógena esta proteína. Contrariamente a lo propuesto en anteriores publicaciones, el pool de *CHFR* endógeno se localizaría en el citoplasma durante la interfase pero migraría al huso mitótico durante la mitosis permaneciendo hasta la anafase tardía. Se propuso la existencia de un umbral de expresión para *CHFR*, lo que explicaría las diferencias con las anteriores publicaciones. Cuando se sobrepasa dicho umbral, *CHFR* es redistribuido al núcleo y degradado vía autoubiquitinización en el proteasoma [252].

Se tiene conocimiento de que *CHFR* se une a las tubulinas en el huso mitótico. Recientemente también se ha identificado la existencia de una nueva proteína que interaccionaría con *CHFR* en el huso mitótico. TCTP (translationally controlled tumor protein) es una proteína ampliamente expresada y con múltiples funciones. Se piensa que dicha unión está mediada por la interacción entre *CHFR* y las tubulinas [252].

En base a estos últimos datos, *CHFR* funciona como un sensor de la despolimerización de los microtúbulos. Se localiza en el huso mitótico en asociación con TCTP y tras la disrupción provocada por los agentes antimicrotúbulos ambas proteínas se liberan, lo que permite que *CHFR* interaccione con otros sustratos como Aurora A y PLK1, impidiendo la continuidad del ciclo celular [252].

1.5.5 Inactivación de *CHFR* por hipermetilación aberrante y sensibilidad a antimicrotúbulos.

- *Búsqueda de alteraciones genéticas en el gen de CHFR*

CHFR se expresa ampliamente en tejidos normales. Sin embargo, la expresión de su ARNm y proteína es nula en algunas líneas celulares tumorales (dos de colon y

una de neuroblastoma). Scolnick y Halazonetis estudiaron las 5 líneas que no presentaban expresión de *CHFR* en busca de posibles mutaciones. En una de ellas (osteosarcoma) hallaron una transición C→T en la hebra no codificante. Dicha alteración ocasiona una substitución en la región CR altamente conservada de *CHFR*, en la posición 580 de V (Valina) por M (Metionina). Dicha mutación fue asociada a una pérdida de la función del control del ciclo celular cuando esta línea celular era expuesta a nacodazol [238].

En muestras de tejido de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico se pudo identificar nuevos polimorfismos: dos sustituciones de aminoácidos en el codón 270 y 497 y un polimorfismo silencioso en los codones 295 y 569. Además, dos muestras presentaron la transición C→T en el codón 580. Si bien se observó que ambos casos presentaban pérdida de heterocigosidad, el alelo responsable de la reducción de la función se perdió en uno de los casos pero se mantenía en el otro [253]. En un estudio posterior, también con tejido de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, se identificaron nuevos polimorfismos y tres de los pacientes mostraron mutaciones missense, y una de ellas asociadas con pérdida de heterocigosidad [254].

Estos hallazgos sugieren que *CHFR* raramente se encuentra inactivado por alteraciones genéticas, por lo que se pensó en que la falta de expresión de este gen podría asociarse a cambios epigenéticos.

– *Inactivación por hipermetilación aberrante de CHFR y su implicancia en el control del ciclo celular*

Gran número de genes implicados en procesos carcinogénicos se inactivan mediante mecanismos epigenéticos. Mizuno y colaboradores fueron los primeros en investigar la región promotora de *CHFR* en busca de posibles islotes CpG cuya metilación podría dar una explicación de pérdida de función de este gen en numerosas líneas celulares tumorales. Trabajaron en primera instancia con líneas celulares de cáncer de pulmón evitando la posible contaminación con linfocitos y células del estroma que puede ocurrir si se trabaja con tejido tumoral. De las 16 líneas estudiadas, QG90, QG56 y Calu6 mostraron estar ampliamente metiladas en la zona promotora. Estas

líneas presentaban una depleción de la expresión de *CHFR* al ser analizadas por northern blot. Además tras el tratamiento con agentes demetilantes se reestableció la expresión de *CHFR*, lo que permitió confirmar la naturaleza epigenética de la inactivación de *CHFR*. Con posterioridad se examinaron 44 tejidos de pacientes con cáncer de pulmón de los cuales 37 (19%) presentaban metilación en la región promotora en los islotes 6, 14, 25, 26 y 34 [253].

Estos datos difieren con los presentados por Corn y colaboradores que hallaron un 10% de metilación en tejido de cáncer de pulmón no microcítico. Este grupo amplió la investigación hacia otros tumores y postuló la hipótesis de que la inactivación de este gen ocurre con distintas frecuencias en distintos tipos celulares. Además el hallazgo de hipermetilación aberrante de *CHFR* en tejido de normal de colon y su asociación con la edad de los pacientes permitió proponer un mecanismo único en la carcinogénesis de cáncer de colon [255].

La posibilidad de reestablecer la expresión de *CHFR* en líneas celulares al tratarlas con inhibidores de la metiltransferasas permite aseverar que la hipermetilación de la zona promotora de *CHFR* es responsable de dicha falta de expresión. Este hecho se comprobó en líneas celulares que no expresan *CHFR* en las que la inactivación de DNMT1 y DNMT3b favorece su reexpresión. Concomitantemente se observó deacetilación de las histonas H3 y H4, siendo este otro factor determinante en la naturaleza epigenética de la inactivación de *CHFR* [256].

La falta de expresión de *CHFR* se asocia a un mayor índice mitótico. El análisis por citometría de flujo reveló que dichas células son incapaces de detener el ciclo celular al ser tratadas con docetaxel, lo que demuestra la importancia del papel de *CHFR* en el control de mitosis del ciclo celular [256].

Estudios recientes en líneas de cáncer de mama han demostrado que la falta de expresión de *CHFR* se asocia a un fenotipo maligno más agresivo, con elevada tasa de índice mitótico, mayor crecimiento tumoral, invasividad y aneuploidía. Sin embargo dichas células, tal como se había evidenciado con anterioridad, resultan ser más sensibles a los inhibidores de los microtúbulos. Esto permite corroborar la implicancia de *CHFR* como un gen supresor de tumor y su posible utilización como marcador predictivo de tratamiento [257].

Hasta el presente sólo un centro de investigación ha trasladado dichos resultados a un pequeño grupo de pacientes (n=12) con cáncer gástrico avanzado tratados con

Introducción

antimicrotúbulos. El 86% de ellos con *CHFR* metilado mostraron una regresión o falta de progresión en comparación con el 80% de los pacientes con *CHFR* no metilado que progresaron tras el tratamiento. Sin embargo, sería necesario un estudio con mayor número de pacientes para correlacionar respuesta con el estatus de metilación de *CHFR* [258].

Son numerosas las investigaciones desarrolladas para conocer la frecuencia de hipermetilación de *CHFR* en los distintos tumores y las implicancias biológicas de este evento [259-261]. La amplia variedad de tumores en los que *CHFR* se encuentra metilado y la sensibilidad a los agentes antimicrotúbulos conferida por esta alteración epigenética, permitiría su empleo como marcador predictivo de tratamiento con inhibidores de los microtúbulos. Además, debido a la metilación de *CHFR* parece ser tumor específica podría también ser empleado como marcador predictivo de recurrencia [258, 259].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón no microcítico avanzado es una enfermedad de mal pronóstico. Hasta el momento ninguna de las combinaciones de quimioterapias empleadas en su tratamiento ha demostrado ser superior. Se ha logrado mejores índices de respuesta pero la supervivencia global es prácticamente la misma. Sumado a este hecho, muy pocas investigaciones se han interesado en evaluar el efecto de segundas líneas de tratamiento en la supervivencia de estos pacientes.

Son numerosos los estudios que han demostrado la importancia de la investigación de las diversas alteraciones genéticas y epigenéticas en ADN tumoral circulante de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. La posibilidad de trabajar con un material tan accesible como la sangre periférica permite, de una manera no invasiva, ampliar el campo de estudio a aquellos pacientes que carecen de pieza tumoral. El estudio de muchos de estos genes podría ser de gran utilidad para hallazgo de nuevos marcadores predictivos de respuesta a los distintos esquemas de tratamiento y encontrar subgrupos de pacientes que se beneficiarían.

Considerando estos hechos, suponemos que ***“es posible el empleo de CHFR como marcador molecular predictivo en suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado”***

Los objetivos planteados para la realización de este trabajo son los siguientes:

Objetivo 1: “Estudiar el estado de metilación de CHFR en ADN tumoral circulante de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado”.

- 1.1 Analizar la presencia de metilación de *CHFR* en suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.
- 1.2 Correlacionar la metilación de *CHFR* en suero las características clínicas de este grupo de pacientes.
- 1.3 Correlacionar la metilación de *CHFR* con supervivencia, tiempo a la progresión y respuesta de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado tratados con agentes quimioterápicos.
- 1.4 Identificar subgrupos de pacientes puedan beneficiarse del tratamiento de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*.

Objetivo 2: “Estudiar la influencia de segundas líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.”

- 2.1 Evaluar la importancia del tratamiento en segunda línea en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.
- 2.2 Determinar si existe alguna asociación entre el estado de metilación de *CHFR* en suero y la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.
- 2.3 Identificar factores pronóstico para la supervivencia en pacientes tratados en segunda línea.

Objetivo 3: “Examinar en un modelo de líneas celulares de cáncer de pulmón el efecto del tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib.”

- 3.1 Analizar el estado de metilación de *CHFR* en líneas celulares.
- 3.2 Correlacionar el estado de metilación con la expresión de *CHFR* en líneas celulares.
- 3.3 Estudiar la viabilidad celular tras el tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib
- 3.4 Correlacionar los estudios de viabilidad celular con la expresión de *CHFR*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ASPECTOS GENERALES

3.1.1 Aparatos

En la tabla a continuación se enumeran los distintos equipos utilizados durante la realización de este trabajo.

Aparato	Modelo	Marca y Origen
Agitador de placas	Unimax 2010	Heidolph, Alemania
Agitador rotador de tubos	Movil Rol	Selecta, España
Balanza	TE-153-S	Sartorius, Alemania
Baño térmico		Bioblock Scientific, Francia
Bloque térmico	Multiplaces	Selecta, España
Bomba de vacío	ME-2	Vaccubrand, Alemania
Cámara de recuento de Neubauer		Afora,
Campana de flujo laminar vertical	Mini UV/PCR	Telstar, España
	Bv-30/70	Telstar, España
Centrífuga de eppendorf	Espectrafuge 16M	Labnet, España
Centrífuga de eppendorf refrigerada	2K15	Sigma, Alemania
Centrífuga de tubos	CR4I	Jouan, Francia
Congeladores de - 80	UN-9668-E	Nirco, España
Congeladores de -20	GSND-3323	Liebherr, España
Cubetas de electroforesis para geles de agarosa	MIDI, E3	Ecogen, España
Cubetas de electroforesis para geles de poliacrilamida	Mini PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad, EEUU
Espectrofotómetro	NanoDrop 1000	Thermo scientific, UK
Estufa de cultivo	3548	Forma Scientific, EEUU
Fuentes de alimentación para electroforesis	PS-503	Labnet, España
Lectora de placas de 96		BioWhittaker, EEUU
Microondas		Sharp
Micropipetas		Gilson, EEUU
Microscopio	CK2	Olympus, Japón
pH metro	Mirco pH-2100	Crison, España

Pipeta multicanal		Finnepipette
Termocicladores	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystem, EEUU
Transiluminador UV	ChemiDoc System	BioRad, EEUU
Secuenciador	Sequencer analyzer 3100	Applied Biosystem, EEUU
Sistema de vacío para limpieza de ADN por columnas	Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, EEUU
Vortex	Reax top	Heidolph, Alemania

3.1.2 Pacientes

3.1.2.1 Criterios de inclusión

Se estudiaron 366 pacientes de 444 incluidos en un estudio multicéntrico del Grupo Español de Cáncer de Pulmón. Los pacientes se consideraban elegibles si presentaban cáncer de pulmón con estadios IV o IIIB (con efusión pulmonar) histológicamente confirmados como CPNM. Se consideró también como criterio el performace status (PS) 0 (asintomático y activo) o 1 (sintomático, ambulatorio y restringido en actividad vigorosa) del Eastern Cooperative Oncology Group; de no menos de 18 años; con adecuada función hematológica (hemoglobina de hasta 9g/dl, neutrofilia de hasta 1500/mm³ y recuento plaquetario de hasta 100.000/mm³); con adecuada función renal (creatinina sérica menor a 1.5 veces el límite superior normal); adecuada función hepática (bilirrubina menor a 1.5 veces el límite superior normal, aspartato amino transferasa y alanina amino transferasa menor a 5 veces el limite superior normal). Los pacientes con metástasis cerebrales y con previa quimioterapia fueron excluidos, al igual que aquellos con PS 2 (sintomáticos, ambulatorios, capaces de cuidarse a si mismos y de pasar mas del 50% de las horas despiertos fuera de la cama), basados en estudios previos en los que se observa que los mismos presentan una elevada tasa de efectos adversos y peor supervivencia.

3.1.2.2 Aleatorización y tratamiento

Los pacientes fueron aleatorizados de acuerdo a los niveles de expresión de ERCC1 en una rama control y dos genóticas en una proporción 1:2. Los pacientes en el brazo control recibieron 75 mg/m² de docetaxel, seguido de 75mg/m² de cisplatino cada tres semanas. Los pacientes en el brazo genotípico recibieron el tratamiento de acuerdo a los niveles de ERCC1: aquellos con niveles bajos recibieron 75 mg/m² de docetaxel, seguido de 75mg/m² de cisplatino en el día 1, cada tres semanas; aquellos con niveles altos recibieron 40 mg/m² de docetaxel, seguido de 1000mg/m² de gemcitabina en el día 1 y 8, repetido cada tres semanas.

Los pacientes recibieron tratamiento durante seis ciclos o hasta comenzar progresión de la enfermedad, muerte u un efecto adverso inaceptable.

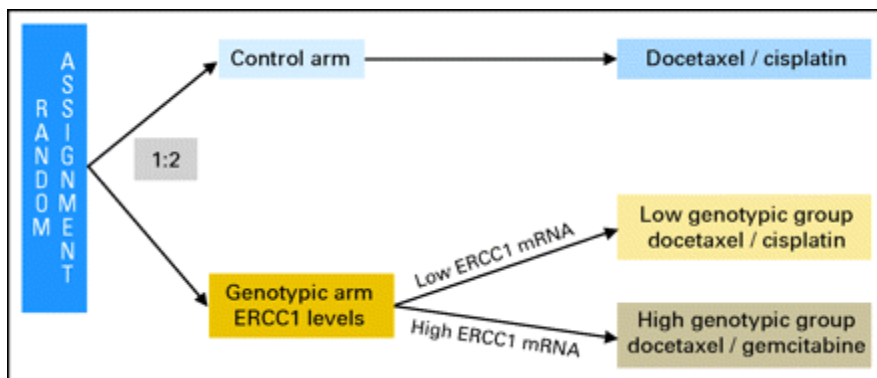


Fig 12: Modelo de aleatorización empleado en el estudio multicéntrico del Grupo Español de Cáncer de Pulmón

Todos los pacientes fueron sometidos a examen clínico, dos radiografías de tórax y tomografía computarizada de tórax y abdomen. La tomografía cerebral u ósea solo fue empleada en caso de sospechar metástasis cerebrales u óseas. Después de cada ciclo de quimioterapia a los pacientes se les practicó un examen físico y pruebas analíticas para controlar las funciones hematológicas, renales y hepáticas. La supervivencia se calculó desde el día de la inclusión hasta la muerte o la última progresión clínica.

3.1.3 Líneas celulares

En la realización de este estudio se trabajó con las siguientes líneas celulares.

– **H460:** ATTC Number: HTB-177. Línea de carcinoma de pulmón de célula grande. Proviene del fluido pleural de un paciente con cáncer de pulmón de célula grande. Expresan niveles de ARNm de p53 comparables al tejido pulmonar normal y carecen de anormalidades estructurales del ADN destacables.

– **Calu-6:** ATTC Number HTB-56. Línea carcinoma anaplástico de pulmón.

– **H209:** ATTC Number HTB-172. Línea de carcinoma microcítico de pulmón. Deriva de una metástasis en médula ósea de un paciente previo tratamiento. Expresa elevados niveles de 4 marcadores bioquímicos que la reconocen como una auténtica célula de cáncer microcítico de pulmón. Carece de anormalidades estructurales del ADN destacables. Expresa niveles normales de ARNm de p53 y una Rb incapaz de fosforilarse.

– **A549:** ATTC Number CCL-185. Línea de carcinoma de pulmón. Deriva del cultivo de tejido carcinomatoso de pulmón de un paciente caucásico de 58 años.

– **H23:** ATTC Number CRL-5800. Línea de adenocarcinoma no microcítico de pulmón. Deriva de un paciente con cáncer de pulmón previamente tratado. Presentan mutaciones del codón 12 de K-ras y del codón 246 de p53.

– **HCC-827 WT:** Línea derivada de la **HCC-827** ATTC Number CRL-2868 de adenocarcinoma de pulmón. Fueron cedidas por la Universidad de Navarra, España. Después de un cultivo prolongado, perdieron la hipersensibilidad a Erlotinib. La secuenciación del exón 19 demostró la ausencia de la mutación en el dominio tirosina quinasa de EGFR (deleción E726- A750) presente en la línea original.

– **SK-MES-1** ATTC Number HTB-58. Línea de carcinoma escamoso de pulmón. Derivan de metástasis de fluido pleural.

Las condiciones de cultivo y ensayos en los que se emplearon estas líneas celulares se explicaran en los distintos apartados.

3.2 ENSAYOS REALIZADOS EN PACIENTES

3.2.1 Detección de la hipermetilación de *CHFR* en ADN circulante

3.2.1.1 Material y reactivos de uso general empleados

Materiales y reactivos de uso general

Material de plástico:

- Pipetas de 10 mL (APL, España)
- Pipetas pasteur (VWR, España)
- Tubos de 15 y 30 mL (Nunc, Dinamarca)
- Tubos eppendorf de 1,5 mL (Nirco, España)
- Tubos y tapas para PCR (Attendbio, España)

Material de vidrio:

- Enlernmeyer

Reactivos y soluciones:

- Aceite mineral (Sigma, Alemania)
- Agua destilada calidad biología molecular (AppliChem, Alemania), se preparan alícuotas de trabajo
- Etanol absoluto (AppliChem, Alemania) y una solución al 70%
- Glicógeno (Roche Diagnostic, Suiza)
- Isopropanol (AppliChem, Alemania), se emplea una solución al 80%
- Hidróxido de sodio (Sigma, Alemania)
- Bisulfito (Sigma, Alemania)
- Hidroquinona (Sigma, Alemania)
- Agarosa (Ecogen, España)
- Bromuro de etidio (Sigma, Alemania)

KITs

- Columnas para concentrar ADN de Microcon (Millipore, EEUU)
- QIAmp. Blood Mini Kit (QIAGEN, EEUU)
- Wizard DNA Clean up System (Pomega, EEUU)

3.2.1.2 Extracción y concentración de DNA de muestras de suero

Se recogió la sangre periférica en tubos con activadores de la coagulación. Estos tubos contienen un gel que funciona como una barrera que separa el suero de la fibrina y células durante la centrifugación. El suero se separó por doble centrifugación con el objetivo de evitar la contaminación celular.

Materiales y métodos

Se realizó la extracción de ADN (Qiagen, Valencia, CA) a partir de 800 microlitros de suero utilizando QIAmp DNAMini blood kit y se resuspendió con agua en un volumen final de 50 microlitros.

Posteriormente el ADN se concentró utilizando columnas Microcon (Millipore, EEUU) y se obtuvo un volumen final de 10 microlitros.

Protocolo Nº 1: Obtención de suero a partir de sangre periférica

1. Se recoge la sangre en tubos de 10 mL con gel SST y activador de la coagulación.
2. Se mantiene en posición vertical durante aproximadamente una hora para permitir que el coágulo se establezca.
3. Posteriormente se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Se transfiere el suero a un nuevo tubo estéril de 15 mL.
5. Se centrifuga nuevamente a 2500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Se transfiere a un nuevo tubo estéril y almacena a -20 hasta su empleo.

Protocolo Nº 2: Extracción de ADN sérico mediante kit QIAmp. Blood Mini Kit (Qiagen, EEUU)

Antes de comenzar es preciso descongelar las muestras, encender bloque térmico y preparar los reactivos del kit: Buffer AW1, AW2 y Proteasa según las indicaciones

Buffer AW1: se añaden mL y se alícuota para su empleo

Buffer AW2: se añaden mL y se alícuota para su empleo

Proteasa: se añaden 5,5 mL de disolvente en el vial que contiene la proteasa liofilizada y se mezcla (evitando la agitación) hasta su disolución. Se alícuota y almacena congelada hasta su empleo

1. Se colocan 40 µl de Proteasa de QIAGEN en el fondo de un eppendorf de 1,5 mL estéril, 400 µl de suero y 400 µl de buffer AL y mezclar mediante vortex durante 15 segundos. Incubar a 56°C durante 1 hora y media.
2. Posteriormente se centrifuga brevemente el eppendorf para eliminar cualquier gota que pueda haber quedado en la parte superior de la tapa.
3. Se añaden 400 µl de Etanol Absoluto y mezcla nuevamente con el vortex durante aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, se centrifuga brevemente el eppendorf para eliminar cualquier gota que pueda haber quedado en la parte superior de la tapa.
4. Se añade la mitad del contenido del eppendorf a una columna de centrifugación QIAmp con su correspondiente tubo colector de 2 mL, y se centrifuga a 8000 rpm durante 2 minutos.
5. Se descarta el efluído y coloca la columna en un tubo colector de 2 mL nuevo. Se añade el resto del contenido del eppendorf y repite la centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
6. Se añade a la columna 500 µL de buffer AW1 y centrifuga a 8000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
7. Se añade a la columna 500 µL de buffer AW2 y centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL.
8. Se añade a la columna 70 µl de agua destilada estéril (Sigma) precalentada a 56°C.
9. Se incuba la columna cerrada en el baño a 56°C durante 5 minutos y 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Se centrifuga la columna a 10000 rpm durante 5 minutos. Se recoge el efluído en un eppendorf nuevo y se desecha la columna.
11. Se almacena el tubo a 4°C o -20°C si es durante un periodo más prolongado de tiempo.

Protocolo N° 3: Concentración de ADN en columnas de Microcon (Millipore, EEUU)

1. Se inserta la columna del kit dentro del eppendorf.
2. Se añade la muestra a la columna sin tocar la membrana de la columna con la pipeta y cierra la tapa.
3. Se centrifuga a 2700 rpm durante 12 minutos.
4. A continuación se invierte la columna en un nuevo tubo eppendorf provisto por el kit y se centrifuga a 2860 rpm durante 3 minutos.
5. Se añaden 10 µl de agua destilada estéril (Sigma) a la columna y centrifuga a 2860 rpm durante 3 minutos.
6. Se descarta la columna y guardar el tubo a 4°C o -20°C si es durante un periodo mas prolongado de tiempo.

3.2.1.3 Modificación con bisulfito

El ADN (aproximadamente 1 microgramo) fue sometido a una modificación química con bisulfito de sodio (Sigma, Alemania). Este procedimiento convierte las citosinas no metiladas en uracilo, dejando como tal aquellas que se encuentran metiladas. El ADN se desnaturalizó con hidróxido de sodio 2 mM (Sigma, Alemania) durante 20 minutos a 37°C. A continuación, se agregó una solución de hidroquinona 10 mM (Sigma, Alemania) y bisulfito sódico 3 M (Sigma, Alemania), se mezcló y se incubó durante 16 horas al abrigo de la luz a 50°C. El ADN se purificó mediante columna (Pomega, Madison, WI) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con hidróxido de sodio 3 mM. Después de la precipitación con etanol, el ADN se resuspendió en agua (AppliChem, Alemania).

Protocolo N° 4: Modificación con bisulfito de sodio

Preparación de reactivos:

- Hidróxido de sodio 10 M: se pesan 4g y llevan a volumen final de 10 mL con agua destilada. A partir de esta solución madre se preparan las soluciones 3 M y 2 M.
- Hidroquinona 10 mM: se prepara una solución madre 100 mM, a partir de la cual se prepara la 10mM. Se pesan 0,101 g y llevan a volumen final de 10 mL con agua destilada. Mantener al abrigo de la luz.
- Bisulfito de sodio 3 M, pH=5.0: se pesan 1,88 g por cada 5 mL de solución. Se calcula el volumen final de dicha solución a emplear en cada modificación en función al número de muestras. Una vez disuelto corregir el pH hasta 5 mediante el empleo de la solución de Hidróxido de sodio 10 M y llevar a volumen final.
- Isopropanol 80%, etanol absoluto y etanol al 70% que deben estar refrigerados.
- Colocar alícuotas de agua destilada en el bloque térmico.

Protocolo Nº 4: Modificación con bisulfito de sodio (continuación)

1. Se realizan diluciones de ADN, de aproximadamente 1 µg del mismo, en un volumen final de 50 µl de agua destilada. En el caso de ADN proveniente de suero añadir 40 µl de agua destilada al ADN recuperado de la columna de concentración. Se preparan diluciones para control positivo (DNA universal metilado, Chemicon) y control negativo (linfocitos de sangre periférica de pacientes sanos)
2. Se añade 5,5 µl de NaOH 2M e incuba a 37°C durante 15 minutos (este paso permite la desnaturalización de ADN para permitir la reacción con el bisulfito de sodio).
3. Se añade 30µl de hidroquinona recientemente preparada a cada tubo (la hidroquinona es un agente antioxidante que previene la oxidación de intermediarios durante el tratamiento con bisulfito) y 520µl de bisulfito de sodio 3M pH=5, recientemente preparado y se mezcla.
4. Se añade una fina capa de aceite mineral e incuba a 50°C durante 16 horas al abrigo de la luz.
5. Transcurrido este tiempo se elimina la capa de aceite
6. En un tubo eppendorf nuevo se añade 1 mL de resina de limpieza (Pomega, EEUU) y se mezcla con el ADN modificado.
7. Se pipetea esta mezcla y coloca en la columna. Aplicando vacío, se permite el paso de esta mezcla por la columna. Las llaves debe ir cerrándose para impedir que la resina se reseque.
8. Se lava la columna añadiendo 2 mL de isopropanol 80% frío y se reaplica vacío para que pase a través de la columna. Asegurarse de que se ha eliminado todo el isopropanol.
9. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y centrifuga a 10.000 rpm durante 2 minutos para eliminar posibles restos de isopropanol.
10. Se transfiere la columna a un tubo eppendorf limpio y añaden 50 µl de agua precalentada a 60°C. Se colocan las columnas entre 12 -15 minutos a 60°C y luego se centrifugan durante 30 segundos a máxima velocidad para recuperar el ADN en el eluido.
11. Se añade 5,5 µl de NaOH 3M e incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Se añade 1 µg de glicógeno como carrier (Roche), 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2.
13. Se precipita el ADN durante 3 horas a -20°C.
14. Luego se centrifuga a 12.500 rpm a 4 °C durante 25 minutos.
15. Se descartar el sobrenadante y se realiza un lavado con 200 µl de etanol 70% frío.
16. Se centrifuga 12.500 rpm a 4 °C durante 5 minutos.
17. Se eliminar el sobrenadante y seca el pellet.

Se resuspenden en 40 µl de agua destilada y almacenan alicuotadas a -20°C hasta su empleo

3.2.1.4 Análisis por Methylation-Specific PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) es una técnica que permite la amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos de un modo selectivo, a partir de poca cantidad de material. A través de la reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación (**MS-PCR**) es posible identificar de un modo sensible y específico los posibles islotes CpG metilados. Para tal efecto es necesario el diseño de cebadores que permitan distinguir entre los alelos metilados y no metilados de ADN, previamente modificado con bisulfito, como se describió anteriormente.

Reactivos empleados.

Para llevar a cabo la reacción de MSP se utilizaron los siguientes reactivos:

– Buffer o Tampón de PCR: mantiene las condiciones adecuadas para el funcionamiento de la ADN polimerasa. En este caso el buffer empleado tiene una combinación de KCl y (NH₄)₂SO₄ que aumenta la astringencia de las condiciones de unión de los primers, evitando las uniones inespecíficas. su composición es la siguiente: Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl, pH 8,7 (20°C).

– Solución de Cloruro de Magnesio: este ión es necesario para el funcionamiento de la ADN polimerasa, sin embargo su concentración debe ser tal que permita su correcto funcionamiento y evite las uniones inespecíficas de los cebadores.

– Desoxionucleótidos trifosfatos: unidades de nucleótidos que sirven como sustrato para elaborar la nueva hebra de ADN

– Cebadores: se trata de secuencias de entre 20 y 30 nucleótidos que permiten amplificar una secuencia específica del gen en estudio. Uno de ellos se une a la hebra de DNA molde en el sentido 5' → 3' (*sense*) y el otro lo hace en el sentido contrario, 3' → 5' (*antisense*). Como después de la modificación con bisulfito, las hebras de ADN ya no son complementarias, estos se han diseñado tomando como molde la hebra de ADN en el sentido 5' → 3'.

Para que los cebadores permitan distinguir entre el ADN modificado y no modificado y entre los alelos metilados y no metilados, éstos se situaron en regiones ricas en citosina y con islotes CpG en el extremo 3'.

Para el diseño del mismo se utilizó la secuencia descrita en GenBank AC127070 correspondiente al gen de *CHFR*. Los mismos han sido diseñados sobre la zona promotora de *CHFR*, atendiendo a aquellas CpGs cuyo estado de metilación se ha correlacionado con la falta de expresión de dicho gen.

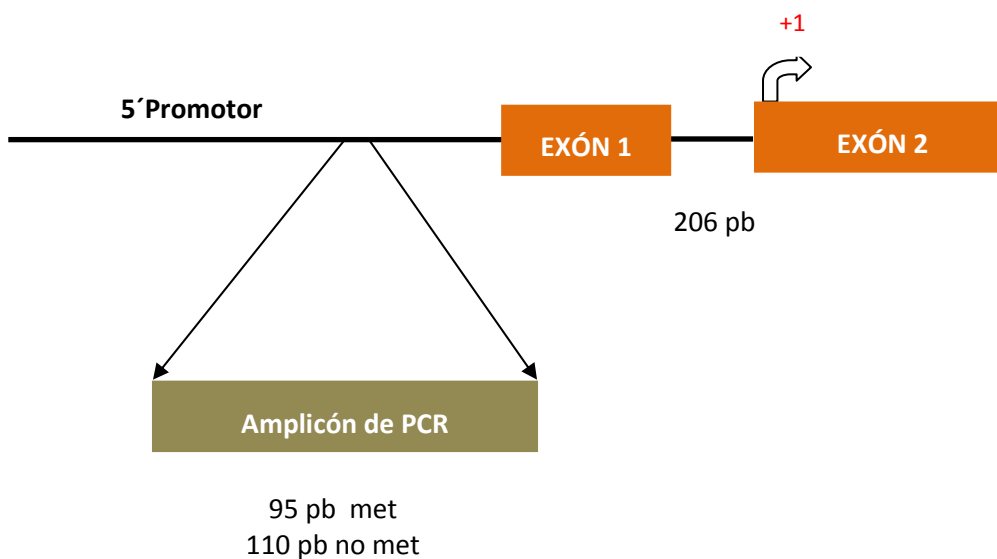
La secuencia de los mismos se muestra a continuación:

5'TTTTCGTGATTCGTAGGCGAC (*met sense*);

5'GAAACCGAAAATAACCCGCG (*met antisense*);

5'TTGTAGTTATTTTTGTGATTTGTAGGTGAT (*unm sense*);

5'TAAAACAAAACCAAAAATAACCCACA (*unm antisense*).



– ADN polimerasa o Taq Polimerasa: es la enzima que se encarga de replicar la hebra de ADN. Inicialmente se obtuvieron a partir microorganismos adaptados a vivir a elevadas temperaturas. La HotStar DNA polimerasa (QIAGEN, EEUU) empleada en este caso, es una enzima recombinante que es inactiva a temperatura ambiente. Este tipo de enzimas evitan las uniones inespecíficas a bajas temperaturas.

Para la mezcla de MS-PCR se emplearon los reactivos antes descritos en un volumen final de 25 μ l para cada reacción.

	Volumen por muestra (μ l)
Buffer 10X	2,50
MgCl ₂ 25mM	1,50
dNTPs 10mM	0,15
Primer sense 10 μ M	0,25
Primer antiense 10 μ M	0,25
HotStar DNA polimerasa 5 UI/ μ l	0,10
Agua	17,25
ADN molde	3,00

Condiciones de Reacción.

Toda reacción de PCR implica una serie de ciclos a diferentes temperaturas.

Un primer paso de calentamiento hasta 95°C durante 15 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa.

Posteriormente tres pasos que se repiten, en este caso en particular 50 ciclos.

– **Desnaturalización:** se separan las hebras de ADN mediante el calentamiento (95°C) de la muestra durante un periodo de tiempo que oscila entre segundos a minutos. Se permite de esta manera que los cebadores puedan unirse al ADN molde.

– **Unión de los Cebadores o Anealing:** los cebadores se unen a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

– **Extensión de la cadena:** la ADN polimerasa, tomando el ADN molde, sintetiza la cadena complementaria, partiendo del cebador como soporte inicial. Para tal efecto se aumenta la temperatura hasta 72 °C, a la cual la ADN polimerasa presenta su máximo de actividad.

Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de la ADN polimerasa, normalmente 72°C, para finalizar enfriando la muestra a 4°C para su conservación.

A continuación se muestran las condiciones de trabajo empleadas para al MS-PCR.

Temperatura	Tiempo
95°C	15 minutos
95°C	40 segundos
62°C	40segundos
72°C	40 segundos
72°C	7 minutos
4°C	Infinito

} 50 Ciclos

3.2.1.5 Electroforesis de producto de PCR

La electroforesis permite mediante la utilización de una corriente eléctrica controlada separar moléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

La agarosa es un polisacárido cuyas soluciones (de entre 0,5 a 2%) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel, semisólido, al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico a su través, en mayor medida cuanto más grandes sean éstas.

Al preparar el gel se dejan en él unos huecos o pocillos para poder colocar en ellos la muestra, y que así, ésta se vea obligada a introducirse en el seno del gel cuando apliquemos el campo eléctrico.

La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema.

Durante la preparación del gel se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular.

En el presente trabajo se ha procedido a la electroforesis de las muestras en un gel de Agarosa Media EEO (Ecogen, España) al 2% teñido con bromuro de etidio (Sigma, Alemania). La electroforesis se realizó a 90 mV durante una hora y posteriormente se visualizó en el transiluminador UV y se procedió a capturar la imagen correspondiente.

Las muestras se clasificaron como metiladas cuando el alelo metilado estaba presente y como no metilada cuando solo estaba presente el alelo de no metilado.

Protocolo N° 5: Electroforesis en Gel de agarosa

1. Se pesa en un erlenmeyer la cantidad de agarosa necesaria, teniendo en cuenta el % al que se quiere preparar el gel.
 2. Se añade el volumen de TBE necesario (80 mL para geles grandes y 40 mL para geles pequeños)
 3. Se agita para resuspender la agarosa
 4. Se calienta en microondas hasta llevar brevemente a ebullición
 5. Se vuelve a agitar y se comprueba que la agarosa está disuelta.
 6. Mientras que la agarosa se enfría, se prepara la cubeta de electroforesis cerrando con cinta ambos lados y encajando el peine. Comprobar que los dientes no toquen el fondo de la cubeta pero tampoco queden demasiado elevados
 7. Una vez que el gel ya no desprende vapores se añade 2-3 μL (geles pequeños) o 6-8 μL (geles grandes) de bromuro de etidio.
- ATENCIÓN:** El bromuro de etidio es mutágeno, se debe manejar con cuidado y utilizar sólo material de vidrio y pipetas marcados para su uso
8. Se vierte la agarosa en la cubeta y espera a que solidifique completamente
 9. Se retira el peine, mete la cubeta en el tanque de electroforesis y se añade el tampón TBE hasta cubrirla.
 10. Se mezclan las muestras con tampón de carga
 11. Se cargan las muestras en los pocillos. En el primer pocillo, se coloca 2,5 μL de marcador de peso molecular
 12. Se corre la electroforesis a unos 90 mV. Se sigue el desplazamiento del BPB (banda azul oscura) y el XC (azul clara)
 13. Se examina en el transiluminador bajo luz UV

3.3 ENSAYOS REALIZADOS EN LINEAS CELULARES

3.3.1 Estudio del estado de metilación de *CHFR* en líneas celulares de cáncer de pulmón

3.3.1.1 Materiales y reactivos de uso general

Material y reactivos de uso general

Material de plástico:

- Criotubos de 1.8 mL con rosca interna (Nunc, Dinamarca)
- Contenedor refrigerado (Nalgene, EEUU)
- Filtros 0.22 μm (Nalgene, EEUU)
- Frascos de cultivo de plástico estériles de 25 i 75 cm^2 (Nunc, Dinamarca)
- Pipetas de 5 y 10 mL estériles (APL,
- Tubos de centrifuga estériles de 15 y 30 mL (Nunc, Dinamarca)

Medios, soluciones y reactivos:

- Azul de tripán (Gibco, Invitrogen, España)
- DMSO (Dimetil sulfóxido) (Sigma Alemania)
- ExoSAP (USB, EEUU)
- FBS (suero fetal bovino) (Biological Industries, Israel)
- L-Glutamina (Biological Industries, Israel)
- RPMI 1640 (Biological Industries, Israel)
- Tripsina- EDTA (PAA Laboratories, Austria)
- EDTA 0,125 M (AppliChem, Alemania)
- Acetato de sodio 3M pH 5,6 (AppliChem, Alemania)

3.3.1.2 Condiciones de cultivo

Las distintas líneas celulares se cultivaron de manera rutinaria en frascos de cultivos estériles. Estos frascos se conservaban en una estufa de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad relativa del 80%. El cambio del medio de cultivo se llevó a cabo según los requerimientos de cada línea celular. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se tripsinizaron para realizar nuevos subcultivos y una parte se congeló a -80°C y disponer de una reserva de cada línea celular.

Protocolo N° 6: Preparación de medio de cultivo

Existen distintos medios de cultivo (DMEM, RPMI, etc), adecuados para diferentes tipos de líneas celulares.

El medio que se vende comercialmente "incompleto", tiene todos los componentes necesarios para el crecimiento celular excepto suero y glutamina (se almacena en las botellas a 4°C). El suero y la glutamina se almacenan por separado a -20°C.

El suero requiere de la inactivación del complemento para su utilización. Para ello, se calienta a 54°C durante unos 20 min. A continuación, se alícuota (50mL) y guarda a -20°C. Estas alícuotas están listas para su utilización. La L-glutamina está lista para usar. Sólo debe descongelar, agitar para disolverla y alícuotarla y mantenerlas a -20°C hasta su utilización.

Para preparar medio de cultivo completo:

1. Se sacar una botella de 0,5 L de medio "incompleto"
2. Se descongela una alícuota de 50 mL de FBS inactivado y una alícuota de 5 mL de L-glutamina (más antibióticos, en su caso), que se añadirán al medio
3. Se guarda el medio completo a 4°C. (Es estable alrededor de 2 meses)
4. Una vez preparado el medio completo, es conveniente dispensar unos 5-10 mL en una placa e incubarlo en la estufa de cultivos. Al día siguiente, se comprueba por observación microscópica que no está contaminado, y ya se puede utilizar. Si aparece contaminación, debe descartarse.

Protocolo N°7: Mantenimiento de los cultivos celulares

Descongelación:

Las células normalmente se congelan en medio completo con un 20% de FBS y un 10% de DMSO. Este último es tóxico y, durante el proceso de descongelación, las células deben estar el menor tiempo posible en contacto con él.

1. Se saca el vial con las células del congelador de -80°C (o N₂ líquido) y se descongela rápidamente en un baño a 37°C
2. Se transfieren las células descongeladas a un tubo de 15 mL
3. Se añaden 5 ó 6 volúmenes de medio de cultivo, primero gota a gota y luego a "golpes" de 0,5 a 1 mL y se va agitando. Este proceso es necesario para diluir de manera lenta el DMSO que contienen las células
4. Se centrifuga a 1500 rpm, 5 min a temperatura ambiente.
5. Mientras se centrifuga, se dispensa el medio de cultivo necesario en los frascos que se vayan a sembrar
6. Se retirar el sobrenadante del tubo por aspiración y resuspende el sedimento (células) en seco, golpeando la base del tubo
7. Se añaden entre 1 a 2 mL de medio de cultivo, homogeneiza las células y transfieren a un frasco (T25 ó T75 en función del número de células = tamaño del sedimento). El frasco se debe rotular con el nombre de la línea, el número de pasos, la fecha y el medio de cultivo.
8. Se comprueba en microscopio invertido si las células están en buen estado (refringentes)

Protocolo N°7: Mantenimiento de los cultivos celulares (continuación)

Tripsinización:

1. Se atempera la tripsina, el medio de cultivo completo y el suero fisiológico a 37°C
2. Se comprueba el estado de las células al microscopio invertido
3. Se retira el medio de cultivo por aspiración
4. Rápidamente, se añade 1,5-2 mL (para T25) o 4-5 mL (T75) de solución fisiológica y se agita para que el tampón lave toda la monocapa de células
5. Se retirar el PBS por aspiración
6. Se añade 1 mL (para T25) o 2,5-3 mL (T75) de tripsina y agita para que la tripsina cubra toda la monocapa de células.
7. Se deja incubar hasta que las células se desenganchen del frasco (1-2 minutos aproximadamente). Para ello, dar unos golpes secos a la base del frasco y mirar a simple vista o al microscopio invertido.
8. Mientras las células se desenganchan, se dispensa medio de cultivo completo en un tubo de 15 mL. El volumen de medio debe ser el doble que el de tripsina empleada
9. Una vez desenganchadas las células, se transfieren al tubo con medio de cultivo y agitan. La tripsina se inactiva al entrar en contacto con los inhibidores presentes en el FBS que lleva el medio completo.
10. Se centrifuga a 1500 rpm, 5 min, temperatura ambiente.
11. Mientras se centrifuga, se añade el medio de cultivo necesario en los frascos a sembrar (unos 5 mL para T25 y 15 mL para T-75). Al rotularlos, añadir un paso más de cultivo.
12. Se resuspende el sedimento (células) en seco, golpeando la base del tubo.
13. Se añade medio de cultivo (1 a 10 mL), homogeneiza las células y transfieren a los frascos.
14. Se comprueba en el microscopio si las células están en buen estado (refringentes) y al día siguiente, si se han adherido al sustrato.

Congelación:

1. Se atempera el contenedor de isopropanol.
2. Se resuspende en seco el sedimento de células tripsinizadas.
4. Se añade el medio de congelación frío; se recomiendan 3 mL si el sedimento viene de un T-75 y 1 mL si viene de un T-25. Se homogeneiza.
5. Se distribuyen alícuotas de 1 mL de la suspensión celular en viales de congelación. Los viales se deben rotular al menos con el nombre de la línea, el n° de pasos y la fecha.
6. Se colocan los viales en el contenedor de isopropanol, que a continuación se debe introducir en el congelador de -80°C
7. Al día siguiente, se sacan los viales del contenedor y guardan en su ubicación definitiva. Las células así congeladas conservan su viabilidad durante varios años a -80°C, o indefinidamente en N₂ líquido

3.3.1.3 Recuento celular

Para mantenimiento de los cultivos y comienzo de los distintos ensayos se contaron las células empleando la cámara de Neubauer. Esta técnica permite no solo realizar un conteo celular sino también evaluar la viabilidad celular mediante el uso de un microscopio invertido y el colorante Tripán blue.

Protocolo N° 8: Recuento celular

Recuento en cámara de Neubauer:

1. En el caso de células que crezcan adheridas al sustrato, tripsinizarlas.
2. En el caso de células que crezcan en flotación, se deben centrifugar y resuspender en seco y luego homogeneizar bien en medio de cultivo.
3. Una vez homogeneizadas, se toman 10 μL de la suspensión de células y transfieren a un eppendorf. A menudo es necesario diluir las células para poder llevar a cabo el recuento. La dilución dependerá de la densidad estimada, y suele estar entre 1/20 y 1/100.
4. Se añaden 10 μL de disolución de Tripán Blue y se mezcla bien.
5. Se coloca un cubre en el centro de la cara superior que lleva los relieves de la cámara de Neubauer.
6. Se pipetea 10 μL de la mezcla células: Tripán Blue entre el cubre y la cámara, de forma que se extienda por una de las áreas.
7. Se pone la cámara bajo el microscopio.
8. Se procede a contar el número de células vivas (y si interesa, por separado, el de muertas) en cada uno de los cuatro campos. Debe estar entre 20 y 200, de lo contrario se debe hacer una nueva dilución. En ningún campo el número de células debe desviarse más de un 25%, aproximadamente. Si la desviación es mayor se puede ignorar ese campo o, aún mejor, repetir el recuento.
9. Se calcula la media de células por campo. Esta se multiplica por 2, por el factor de dilución y por 10^4 . El número resultante es la densidad de células (número de células por mL) en la suspensión.
2: dilución $\frac{1}{2}$ de las células con el colorante
x: mililitros en el que se han resuspendido las células.

3.3.1.4 Extracción y cuantificación de ADN de líneas celulares de cáncer de pulmón

Se realizó la extracción de ADN (Qiagen, Valencia, CA) a partir del pellet de cada línea celular utilizando QIAmp DNAMini blood kit y se resuspendió con agua en un volumen final de 100 y 50 microlitros, previo precalentamiento de la columna con la finalidad de maximizar la extracción.

Posteriormente se procedió a su cuantificación en el NanoDrop 1000. Este instrumento es capaz de cuantificar automáticamente elevadas concentraciones de ADN con el empleo de tan solo 2 μL de muestra.

Protocolo N° 9: Extracción de ADN de líneas celulares

Antes de comenzar es preciso descongelar las muestras, encender bloque térmico y preparar los reactivos del kit: Buffer AW1, AW2 y Proteasa según las indicaciones

Buffer AW1: se añaden mL y se alícuota para su empleo

Buffer AW2: se añaden mL y se alícuota para su empleo

Proteasa: se añaden 5,5 mL de disolvente en el vial que contiene la proteasa liofilizada y se mezcla (evitando la agitación) hasta su disolución. Se alícuota y almacena congelada hasta su empleo

Protocolo N° 9: Extracción de ADN de líneas celulares (continuación)

1. Se colocan 20 µl de Proteasa de QIAGEN en el fondo de un eppendorf de 1,5 mL estéril y 400 µl de buffer AL y mezclar mediante vortex durante 15 segundos Incubar a 56°C durante 1 hora y media.
2. Posteriormente se centrifuga brevemente el eppendorf para eliminar cualquier gota que pueda haber quedado en la parte superior de la tapa.
3. Se añaden 400 µl de Etanol Absoluto y mezcla nuevamente con el vortex durante aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, se centrifuga brevemente el eppendorf para eliminar cualquier gota que pueda haber quedado en la parte superior de la tapa.
4. Se añade la mitad del contenido del eppendorf a una columna de centrifugación QIAmp con su correspondiente tubo colector de 2 mL, y se centrifuga a 8000 rpm durante 2 minutos.
5. Se descarta el efluído y coloca la columna en un tubo colector de 2 mL nuevo. Se añade el resto del contenido del eppendorf y repite la centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
6. Se añade a la columna 500 µL de buffer AW1 y centrifuga a 8000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
7. Se añade a la columna 500 µL de buffer AW2 y centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el efluído y coloca la columna en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL.
8. Se añade a la columna 100 µl de agua destilada estéril (Sigma) precalentada a 56°C.
9. Se incuba la columna cerrada en el baño a 56°C durante 5 minutos y 5 minutos a temperatura ambiente
10. Se centrifuga la columna a 10000 rpm durante 5 minutos. Se recoge el eluido en un eppendorf nuevo.
11. Se coloca la columna en un nuevo tubo eppendorf y se le añaden 50 µl. Se repite el paso 9 y 10. Una vez recogido el eluido, se descarta la columna.

Se almacena el tubo a 4°C o -20°C si es durante un periodo más prolongado de tiempo.

Protocolo N° 10: Cuantificación de ADN (NanoDrop 1000, EEUU)

1. Se enciende el ordenador y se selecciona del menú de principal el programa para detección de ácidos nucleicos.
2. Se coloca primeramente agua como blanco en el pedestal de medición, se cierra el brazo e inicia la determinación empleando el software acoplado al aparato.
3. Una vez realizada la medición, se limpia el pedestal y el punto de contacto del brazo con un papel tissue.
4. Se procede de igual manera con las muestras.
5. Una vez finalizadas las mediciones se puede obtener un informe completo de las determinaciones en el que figura la concentración de cada muestra, su absorbancia y las ratios a 260/280 y a 260/230.
6. Se cierra el programa.
7. Se limpia el pedestal y el brazo con una solución de hipoclorito de sodio al 5%.
8. Se apaga el ordenador.

3.3.1.5 Modificación con bisulfito

Primeramente se prepararon las diluciones de cada línea celular y de los respectivos controles, con la finalidad de partir de una misma concentración de ellas (aproximadamente 1 microgramo). Estas se modificaron tal como se ha descrito anteriormente en el protocolo de modificación con bisulfito N° 4.

3.3.1.6 Secuenciación de una región del promotor del gen de *CHFR*

3.3.1.6.1 Amplificación de una región del promotor del gen de *CHFR*

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó la secuencia modificada con bisulfito de una región del promotor del gen de *CHFR*. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada una de las hebras de ADN.

Para el diseño de cebadores de secuenciación de ADN modificado es necesario considerar los siguientes puntos:

- Incluir varias citosinas que no formen parte de los islotes CpGs, para evitar la amplificación de secuencias de ADN que no sufrieron el proceso de modificación.
- Evitar incluir los islotes CpGs, ya que se desconoce el estado de metilación de las citosinas de los mismos
- Diseñar tanto para una como para otra hebra de ADN ya que estas ya no resultan complementarias tras la modificación
- Evitar amplicones mayores a los 650 pares de bases.

Los cebadores se diseñaron sobre la zona promotora de *CHFR* de la secuencia descrita en GenBank AC127070, abarcando unos 270 pares de bases. La secuencia de los mismos se muestra a continuación:

Materiales y métodos

5'GGTTTTTAGAATTTTTGGGGTTTTT (*Sense*)

5'AAACATTACGACTCCCTCAACTAATC (*Antisense*)

Para la mezcla de PCR se emplearon los reactivos antes descritos en el apartado 3.2.1.4 de MS-PCR en un volumen final de 25 μ l para cada reacción.

	Volumen por muestra (μ l)
Buffer 10X	2,50
MgCl ₂ 25mM	1,50
dNTPs 10mM	0,60
Primer sense 10 μ M	0,50
Primer antiense μ M	0,50
HotStar DNA polimerasa 5 UI/ μ l	0,20
Agua	16,20
ADN molde	3,00

Y las siguientes condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo	
95°C	15 minutos	
95°C	40 segundos	} 50 Ciclos
62°C	40segundos	
72°C	40 segundos	
72°C	7 minutos	
4°C	Infinito	

Según lo indicado en el protocolo N°5, las muestras se cargaron en un gel de Agarosa Media EEO (Ecogen, España) al 2% teñido con bromuro de etidio (Sigma, Alemania). La electroforesis se realizó a 90 mV durante una hora y posteriormente se visualizó en el transiluminador UV y se procedió a capturar la imagen correspondiente.

3.3.1.6.2 Purificación del producto de PCR

Los productos de PCR requieren de un proceso de purificación previo con la finalidad de eliminar cualquier remanente de dNTPs, cebadores o cualquier otro producto empleado en la preparación de la mezcla de PCR que podría interferir en el proceso de secuenciación.

Para tal fin se emplean dos enzimas: una exonucleasa y una fosfatasa alcalina que eliminan mediante su actividad los restos procedentes de la reacción de amplificación del ADN. Se inactivan posteriormente por simple calentamiento a 80°C durante 15 minutos.

Protocolo Nº 11: Purificación de producto de PCR con ExoSAP IT

1. Se transfieren 2 µL de ExoSap, a un nuevo tubo y se añaden 5 µL del producto de la PCR
2. Se mezcla bien pipeteando hacia arriba y abajo, la Exo/Sap es muy viscosa. Si hay burbujas, dar un pulso de centrifuga
3. Se incuba en termociclador, 20 min a 37°C, 15 min a 85°C y α a 4°C

3.3.1.6.3 PCR de secuenciación

Una vez purificado el producto de PCR, se llevó a cabo la reacción de secuenciación mediante el empleo dNTPs marcados cada uno con una sonda de fluorescencia diferente. Posteriormente, durante la electroforesis capilar al pasar por delante del laser, los fluoroforos se excitan y la fluorescencia emitida por cada fragmento de ADN es recogida por una cámara de CCD y el software del equipo asigna a la fluorescencia emitida la base correspondiente.

Se preparó la mix de PCR de la siguiente

	Volumen por muestra (μ l)
Buffer 5X	2,0
Big Dye 3.1	4,0
Primer sense o antiense 1 μ M	3,2
Agua	7,8
Muestra	2,0

Y las siguientes condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo	
95°C	5 minutos	
96°C	10 segundos	} 30Ciclos
50°C	5 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	Infinito	

Protocolo N° 12: Precipitación del ADN

Se precipita el ADN añadiendo a los 20 μ L del producto de PCR

-2 μ L de AcNa 3 M

-2 μ L de EDTA 125 mM

-50 μ L (2 vol) de etanol absoluto (a temperatura ambiente)

1. Se mantiene entre 10-15 min a temperatura ambiente.
2. Se centrifuga durante 20-25 min a 14000 rpm a temperatura ambiente
3. Se retira el sobrenadante con micropipeta
4. Se lava el sedimento con 190 μ L de etanol 70%.
5. Se centrifuga durante 5 min a 14000 rpm y temperatura ambiente
6. Se retira el sobrenadante con micropipeta
7. Se seca a 93°C (en máquina de PCR o baño).
8. Se añade 20 μ L de formamida y resuspende. Si la banda de PCR era débil, la resuspensión de puede hacer en 10 μ L de formamida.
9. Se incuban 3 min a 93°C y después α a 4°C

3.3.1.7 Análisis por Methylation-Specific PCR

El análisis de la metilación de *CHFR* en líneas celulares se llevo a cabo según el apartado 3.2.1.4 y 3.2.1.5 de Material y Métodos

3.3.2 Estudio de la expresión de proteína de *CHFR* en líneas celulares de cáncer de pulmón

3.2.3.4 Consideraciones generales de la técnica de Western blotting

Esta técnica combina la especificidad de de la detección con anticuerpos y la resolución obtenida por la técnicas de electroforesis. Emplea un gel de electroforesis para separar proteínas conforme a su longitud en condiciones desnaturizantes o por su estructura tridimensional en condiciones no desnaturizantes. Posteriormente las proteínas se transfieren del gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF mediante un campo eléctrico perpendicular entre ambos

Material y reactivos de uso general

Material:

- Films (FujiFilms, Japon)
- Hipercassette (Amersham, UK)
- Membrana de Inmunoblot PVDF (BioRad EEUU)

Reactivos:

- Anticuerpo policlonal de ratón anti EGFR sc-03 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)
- Anticuerpo policlonal de ratón anti *CHFR* sc-13287 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)
- Anticuerpo policlonal de ratón anti Actina sc-10731 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)
- Anticuerpo secundario de conejo maracdo con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, EEUU)
- 2 Mercapto etanol (Sigma, Alemania)
- Acrilamida-bis 30% (BioRad, EEUU)
- BCA Protein Assay kit (Pierce, EEUU)
- Azul de bromofenol (ICN, EEUU)
- Glicina (USB, EEUU)
- Immobilom wester (Millipore, EEUU)
- Metanol pa (Fluka, Alemania)
- Ortovanadato de sodio (Sigma, Alemania)
- Persulfato amónico (BiiRad, Alemania)
- PMSF (Sigma, Alemania)
- SDS 20% (AppliChem, Alemania)
- TEMED (AppliChem, Alemania)
- Tris 250 g (VWR, España)
- Tritom X-100 (VWR, España)

Protocolo N°13: Lisis de las muestras para obtener proteínas

1. Primero se debe preparar tampón de lisis (RIPA B) de la forma siguiente (para 1 mL de tampón):
 - Se pesan 1,74 mg de PMSF y disuelven en 50 μ L de etanol absoluto
 - Se añaden 25 μ L de esta disolución a 1 mL de RIPA B incompleto, previamente atemperado. Si se forma un precipitado, calentar brevemente a 50-65°C hasta que se disuelva
 - Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 2 M.
 - Se filtra a través de una membrana de 0,22 μ m
 - Se le añade 1 μ L de disolución de leupeptina 10 mg/mL (se debe guardar a -20° C) y 10 μ L de una disolución de aprotinina (Sigma, mantener a 4°C). Se recomienda añadir también 5,4 μ L de una disolución de ortovanadato sódico 250 mM (se prepara y se guarda a -20° C), sobre todo si se van a analizar niveles de fosforilación.
 - Se guarda el RIPA B completo en hielo. Es un reactivo que requiere su empleo lo más rápido posible.
2. Alternativamente, se puede usar tampón con Tris.Cl 20 mM en lugar de fosfato y con un cóctel de inhibidores de proteasas (una tableta cada 10 mL de tampón).
3. Se toma un fragmento de al menos unos 0,1 g de tumor (preferiblemente 0,2 a 0,4 g), y se lo transfiere a un eppendorf. Se le añade 200-400 μ L de RIPA B completo, en hielo. Siempre se debe trabajar el tumor en etanol/nieve carbónica cuando requiere ser cortado y o pulverizado.
4. Se homogeniza con politrón u homogenizador de vidrio en hielo.
5. Se centrifuga durante 10-15 min a 14000 rpm a 4°C para eliminar restos particulados.
6. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo eppendorf y descarta el sedimento.
7. Se determina la concentración de proteínas por método de Bradford o Lowry.

3.3.2.2 Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford

Esta técnica de cuantificación se fundamenta en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 μ g), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Protocolo N° 14: Cuantificación de la proteínas por el método de Bradford

1. Se prepara una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10 ml de NaCl 0.15 M. La concentración de albúmina en la solución se comprueba con un análisis espectrofotométrico a 278 nm, en el espectro UV; la absorbancia a esta longitud de onda, debe ser de 0.66, si este dato no se obtiene es necesario ajustar la concentración.
2. Las soluciones conteniendo de 10 a 100 μ g de estándar de albúmina, se pipetea en tubos de 12 x 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. El volumen en el tubo de prueba también se ajusta a 0.1 ml con solución de NaCl 0.15 M.
3. Se le agregan 5 ml de reactivo, el cual se prepara de la siguiente forma: se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 litro.

Protocolo Nº 14: Cuantificación de la proteínas por el método de Bradford (Continuación)

4. Se dibuja una gráfica patrón de proteínas: cantidad de albúmina (eje de las abscisas) versus absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de las ordenadas).
5. La solución problema se diluye con NaCl 0.15 M. Se pipetea en cada tubo un volumen de 0.1 ml de la solución problema en tubos de 12 x 100 mm, se le agregan 5 ml de reactivo y se lee a una longitud de onda de 595 nm. Se prepara un blanco que contenga 0.1 ml de NaCl 0.15 M más 5 ml de reactivo.
6. La absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón y se extrapola de esta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

3.3.2.3 Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida-SDS (SDS- Page)

Es una técnica que permite la separación de una mezcla compleja de proteínas en condiciones desnaturalizantes. Se fundamenta en el empleo de un soporte físico constituido por fibras de monómeros de acrilamida entrecruzadas que polimerizan en disolución, en presencia de radicales libres y forman una matriz reticular de consistencia gelatinosa. Los radicales libres aportados por el persulfato de amonio se estabilizan al añadir Temed (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)

Se requiere de dos tipos de geles. Uno superior o apilador, que permite que las proteínas se concentren en una banda estrecha antes de entrar en el gel inferior o separador y que incrementa la resolución al forzar el ingreso simultáneo de toda la muestra al sistema de separación. El gel separador permite la separación de las proteínas en función de su masa molecular.

En este trabajo se empleó un equipo de electroforesis Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, EEUU) de tipo vertical. Los geles realizados tenían un tamaño de 9 cm x 6 cm x 1.5 mm.

3.3.2.4 Eletrotransferencia

Mediante la aplicación de un campo eléctrico se puede transferir las proteínas previamente separadas en un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF.

Se empleó un equipo de Mini- Trans- Blot (Bio-Rad, EEUU).

Protocolo N 15: SDS-Page y transferencia

1. De cada muestra, se toman cantidades iguales de proteína y se mezclan con tampón de carga de electroforesis y con 5% de 2-mercaptoetanol. (Las cantidades totales de proteína a cargar pueden ir de 5 a 200 µg, según la abundancia de la proteína concreta que se quiera analizar).
2. Se colocan las muestras a 100°C durante 5 min.
3. Se las carga en un gel de SDS-PAGE, junto con marcadores preteñidos. Y se los deja correr con límites 150 V y 60 mA (si se usan dos geles, si es uno 80 V).
4. Mientras corre el gel, conviene preparar el tampón de transferencia fresco y guardarlo en la nevera.
5. Una vez que el gel termina de correr, se lo sumerge en tampón de transferencia 10 min a temperatura ambiente en agitación
6. Se prepara en una bandeja con tampón de transferencia el bocadillo de Western de la forma siguiente:
 - Soporte de plástico (cara negra)
 - Esponjita empapada en tampón de transferencia
 - 2 papeles Whatman empapados
 - Gel. Una vez colocado, echarle por encima tampón de transferencia
 - Membrana empapada (NOTA: Si es PVDF, sumergirla en metanol 1 min antes de empaparla)
 - 2 papeles Whatman empapados
 - Esponjita
 - Soporte de plástico (cara transparente)
7. Colocar en la cubeta tampón de transferencia y una mosca pequeña. Se pone el bocadillo en la cubeta de transferencia, la cara negra hacia al lado negro (polo negativo) y la transparente al rojo (positivo). Se coloca el bloque de hielo, guardado hasta entonces a -20°C y se acaba de llenar con tampón de transferencia.
8. Se transfiere con límite a 350 mA y 100 V (para dos geles, para uno 175 mA), durante un tiempo que varía de 1 a 4 horas según el tamaño de la proteína a transferir (es mayor cuanto mayor es la proteína).

3.3.2.5 Detección inmunológica con anticuerpos específicos

Las membranas se incubaron primeramente con un tampón de bloqueo para evitar cualquier unión inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavados y se incubó la membrana con un segundo anticuerpo que reconoce la porción Fc. del anticuerpo primario marcado con una molécula de peroxidasa conjuntamente con un agente quimioluminiscente. La luminiscencia originada en esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de proteína. Una hoja de película fotográfica se coloca contra la membrana, y la exposición a la luz de la reacción crea una imagen de los anticuerpos vinculado a la mancha.

Protocolo N° 16: Detección inmunológica con anticuerpos

Incubación con anticuerpos

Unos 10 minutos antes de que acabe la transferencia, se prepara tampón TBS-T (20-25 mL por membrana) y Blotto (ídem).

1. Acabada la transferencia, se sumerge la membrana en tampón TBS-T en agitación durante 5-10 min.
2. Se decanta el TBS-T y añade el Blotto. Se bloquea durante 3 h o durante toda la noche en agitación. Si se opta por el bloqueo durante toda la noche, debe hacerlo a 4°C y con la cubeta tapada con parafilm para evitar la evaporación del Blotto.
3. Se preparan unos 200 mL de Blotto fresco por membrana. Se elimina el Blotto anterior e incuba la membrana con Blotto fresco más el anticuerpo durante 2 horas. La cantidad de tampón debe ser la mínima suficiente para que la membrana no se quede seca (4-5 mL). Se debe evitar que la membrana no se pegue al fondo de la cubeta.
4. Se lava la membrana con abundante Blotto o TBS-T (entre 15-20 mL) durante 15 min, y luego 3 ó 4 veces durante 5 min.
5. Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario en Blotto durante 1 h.
6. Se lava la membrana con Blotto o TBS-T abundante (15-20 mL) una vez durante 15 min, y luego 3 ó 4 veces durante 5 min.

Revelado

1. Mientras se realiza la incubación con los anticuerpos se coloca 1mL de las disoluciones A de ECL y B en sendos tubos tapados con papel de plata. Se preparan también el resto de los materiales que se necesitan para revelar la membrana:

-Un papel transparente para después envolver la membrana. Que no se ensucie bajo ningún concepto

-Una cubeta bien limpia (con agua y después etanol) y seca donde añadir el ECL a la membrana

-Un taco de papeles de filtro cortados algo más grande que el tamaño de la membrana

-Un cassette de autor radiografía

-Los films de auto radiografía

-Un cronómetro

2. Tras el último lavado, se seca la membrana entre varios papeles de filtro metiéndola en medio y apretando con la mano unos 5 seg. Una vez seca, se la coloca hacia arriba en una cubeta limpia, se mezclan las disoluciones A y B y añade la mezcla por encima de la membrana con una pipeta de 1 mL.

3. Se agita la cubeta durante 1 a 2 minutos controlando que la disolución quimioluminiscente la cubra toda entera. Si el proceso se hace en la cámara oscura, el tiempo puede ser menor.

4. Se saca la membrana de la cubeta, el reactivo y la misma cubeta se pueden usar para membranas posteriores. Secarla bien entre papeles de filtro

5. Se envuelve la membrana en el papel transparente y se la engancha con cinta adhesiva en un lado del cassette.

6. En la cámara oscura y se expone los films a la membrana tiempos variables (1 seg a varias horas), según la intensidad de las bandas. Se puede empezar probando 1 y 3 min.

3.3.3 Sensibilidad a erlotinib solo y en combinación con cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón

3.3.3.1 Materiales y reactivos de uso general

Se emplearon además de los materiales y reactivos de uso general del apartado 3.1.1.1 los siguientes

Materiales y reactivos de uso general

Material de plástico:

- Placas de 96 pocillos de plástico (Nunc, Dinamarca)

Medios, soluciones y reactivos:

- Cisplatino (Pharmacia Upjohn, Suiza)
- Erlotinib (Roche Diagnostics, Suiza)
- MMT (Sigma, Alemania)

3.3.3.2 Ensayos de sensibilidad celular a fármacos

3.3.3.2.1 Tratamiento individual con cisplatino e erlotinib

Las líneas celulares se trataron con concentraciones crecientes de cada uno de los fármacos de manera individual con la finalidad de establecer las dosis inhibitorias 50% (DI50%).

Se determinó la DI50% tras el tratamiento después de 72 horas con erlotinib y con cisplatino después de 24 horas de tratamiento.

Para este procedimiento se empleo el siguiente protocolo.

Protocolo N° 17: Determinación de DI50%

1. Se siembra una placa de 96 con entre 8000 a 10000 células por pocillo empleando una pipeta multicanal en un volumen de 100 µl de medio completo. Se debe evitar sembrar los pocillos del borde de la placa, en su lugar de eso, añadir 100 µl de PBS.
2. A las 24 horas se retira el medio empleando la pipeta multicanal sin tocar el fondo de los pocillos
3. A continuación se añade el fármaco en estudio (cisplatino o erlotinib) en un volumen de 100 µl de medio completo por pocillo.
4. A las 24 o 72 horas se retira el medio empleando la pipeta multicanal sin tocar el fondo de los pocillos
5. Se lava dos veces con PBS
6. Se añaden 100 µl de medio completo por pocillo
7. Se incuba durante 4 días desde el inicio del tratamiento.
8. Se revela con MMT
9. Se emplearon dos placas controles para cada línea celular tratadas solo con cisplatino o erlotinib respectivamente

3.3.3.2 Recuento celular en placa

Para los ensayos de viabilidad celular en placa de 96 pocillos se empleó el recuento indirecto con sales de tetrazolio para la cuantificación de la proliferación de las células tratadas. Las células metabólicamente activas son capaces de producir metabolitos reductores como el NADH y NADPH. Estos compuestos transfieren sus electrones a compuestos intermediarios que reducen el tratazolio del medio en un compuesto coloreado, el formazán. Al morir las células pierden su capacidad metabólica, por lo que la producción de formazán resulta ser directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el medio.

Protocolo N° 18: Recuento celular en placa de 96 pocillos

Recuento celular en placa mediante MMT:

El MMT es fotosensible por lo que se deberá guardar envuelto en papel de aluminio y en campana de disección a 4°C

1. Primero se debe calcular la cantidad de MMT que se necesitará para el ensayo (5,25 mg de MMT por placa)
2. Se requiere preparar una disolución de 7,5 mg de MMT/mL en PBS (0,7mL de PBS por placa que se va a revelar)
3. Se mezcla la disolución de MMT con en el medio no estéril en proporción 1:9 (0,7 mL de disolución de MMT y 6,3 mL de medio por placa)
4. Una vez aspirado el medio de cultivo de las placas con la pipeta multicanal, se añaden 100 µl de la mezcla de MMT/medio por pocillo.

Protocolo N18: Recuento celular en placa de 96 pocillos (Continuación)

5. Se incuban las placas entre 30 minutos y 1 hora a 37°C. Se formará un precipitado de color violeta en el interior de las células, visible a simple vista en la mayoría de los casos.
 6. Se aspira con una pipeta multicanal la mezcla MMT/medio y se añaden 100µl de DMSO no estéril por pocillo
 7. Se realiza la lectura de la absorbancia a 550nm.
 8. El número de células por pocillo se obtiene al extrapolar la lectura en una recta patrón
- La recta patrón se obtiene sembrando en una placa cantidades crecientes de células, por sextuplicado (habitualmente de 500 a 10000). Al día siguiente, se revela la placa y se dibuja la gráfica número de células-absorbancia a 550. La gráfica tiene una parte lineal seguida de una zona de saturación. A la hora de diseñar los ensayos posteriores (de efecto de fármacos), no es conveniente usar un número de células más allá del límite de saturación del ensayo.

3.3.3.2.3 Análisis de citotoxicidad: determinación de sinergia, aditividad y antagonismo.

Los datos se analizaron por el método de Chou i Talay. En cada experimento las células se trataron con diluciones seriadas de cada fármaco de la combinación con ratios fijas de dosis que corresponden a diferentes proporciones de las dosis inhibitorias individuales (típicamente 0,3; 0,25; 0,50; 0,63; 0,75; 0,88; 1; 1,5 y 3 veces de la dosis inhibitoria individual).

Para cada experimento, tanto para la exposición individual como para los tratamientos combinados, se representó el $\log_{10} [(1/f_n)-1]$ (en la que f_n representa las diferentes fracciones de viabilidad obtenidas) frente a \log_{10} dosis, y se construyó una recta de regresión por el método de cuadrados mínimos (en todos los casos se aceptaron aquellas rectas que presentan un coeficiente r^2 superior a 0,95).

De cada una de estas rectas construidas tanto para el tratamiento individual como para la combinación, se obtuvieron el \log DI50 y el de la pendiente m . Ambos parámetros se emplearon para calcular las diferentes dosis de los fármacos administrados individualmente y las combinaciones necesarias para producir los diferentes niveles de toxicidad a partir de la expresión

$$\text{Dosis}_f = \text{Dosis}_{\text{DI50}} [(1-f)/f]^{1/m}$$

Cuando ambos fármacos se administran a ratios fijas, la dosis de la combinación necesaria para producir una fracción de supervivencia puede ser separada en los

componentes de dosis D1 y D2 correspondientes a los fármacos 1 y 2 respectivamente. Para cada grado de toxicidad el parámetro denominado índice de combinación puede ser calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CI = (D1/Df1) + (D2/Df2) + \alpha[(D1.D2)/(Df1.Df2)]$$

En la que:

D1 y D2 son las concentraciones de los fármacos 1 y 2 en la combinación para producir una fracción f de supervivencia.

Df1 y Df2 son las concentraciones individuales de los fármacos 1 y 2 para producir la misma fracción de supervivencia f.

$\alpha=1$ o $\alpha=0$ dependiendo de si los fármacos se consideran mutuamente excluyentes o no excluyentes.

De acuerdo a este método la CI puede tomar los valores:

<0,7; indica sinergismo fuerte

0,7-0,85; indica sinergismo moderado

0,85-1; indica sinergismo leve

1; indica aditividad

>1; indica antagonismo

Protocolo 19: Análisis de citotoxicidad

1. Se siembra una placa de 96 con entre 8000 a 10000 células por pocillo empleando una pipeta multicanal en un volumen de 100 μ l de medio completo. Se debe evitar sembrar los pocillos del borde de la placa, en su lugar de eso, añadir 100 μ l de PBS.
2. A las 24 horas se retira el medio empleando la pipeta multicanal sin tocar el fondo de los pocillos
3. A continuación se añade el cisplatino en un volumen de 100 μ l de medio completo por pocillo.
4. A las 24 horas se retira el medio empleando la pipeta multicanal sin tocar el fondo de los pocillos
5. Se lava dos veces con PBS
6. Se añade el erlotinib en un volumen de 100 μ l de medio completo por pocillo
7. A las 72 horas se retira el medio empleando la pipeta multicanal sin tocar el fondo de los pocillos
8. Se lava dos veces con PBS
9. Se incuba durante 4 días desde el inicio del tratamiento
10. Se revela con MMT
11. Se emplearon dos placas de control para cada línea celular; una para cisplatino y otra para erlotinib

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Asumiendo un nivel de significación de una cola al 5%, una potencia del 80% y queriendo observar una diferencia de respuestas del 15% entre los dos brazos de tratamiento (30% vs 45%), se obtuvo un tamaño de muestra inicial de 297 pacientes y permitiendo un porcentaje de pérdidas de pacientes de un 15%, el tamaño de muestra final requerido fue de 342 pacientes.

La hipótesis primaria del estudio fue comparar los ratios de respuesta entre los brazos de tratamiento control y experimental, mediante el test exacto de Fisher. La correlación entre respuesta y otras variables clínicas así como *CHFR* se llevaron a cabo mediante el test exacto de Fisher o la prueba Chi-cuadrado.

La asociación entre las variables y el estado de metilación de *CHFR* se estudió mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas y se utilizó ANOVA para comparar la edad entre los dos estados de metilación. La normalidad de las variables continuas se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La importancia de cada factor pronóstico se estableció analizando las medidas de riesgo de progresión, supervivencia y respuesta conocidas como Hazard Ratio (HR) en Tiempo a la Progresión y Supervivencia y Odds Ratio (OR) en respuesta, se comparan los riesgos de las categorías de las variables con una que se fija como referencia con riesgo 1. En todos los casos estas medidas van acompañadas por sus Intervalos de Confianza (I.C.) al 95% y sus p-valores

Los modelos de regresión logística univariante se realizaron para establecer una asociación entre cada posible factor pronóstico y la capacidad de predecir respuesta, así mismo se ajustaron modelos de regresión logística multivariante para obtener el OR del estado de metilación.

La relación entre las variables clínicas y el tiempo de supervivencia global (tiempo comprendido entre el día de inicio del tratamiento hasta la muerte o la finalización del estudio) así como el tiempo a la progresión (tiempo comprendido entre el día de inicio del tratamiento al estudio hasta la recidiva o progresión de la enfermedad) se realizó mediante curvas de supervivencia y sus probabilidades fueron estimadas usando la técnica de Kaplan-Meier, utilizando para la comparación de las curvas, la prueba de log-rank.

Materiales y métodos

Mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariante y multivariante se pudo analizar o reajustar el efecto de la metilación sobre la supervivencia y sobre el tiempo a la progresión.

4. RESULTADOS

4.1 Consideraciones generales del estudio GILT

El presente trabajo se llevó a cabo de manera retrospectiva en pacientes incluidos en el estudio GILT (Genotyping Internacional Lung Trial) del Grupo Español de Cáncer de Pulmón. En este estudio, los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado fueron aleatorizados de acuerdo a los niveles de expresión de ERCC1 en una rama control y dos genotípicas en una proporción 1:2. Los pacientes en el brazo control recibieron docetaxel/cisplatino. Los pacientes en el brazo genotípico recibieron el tratamiento de acuerdo a los niveles de ERCC1: aquellos con niveles bajos recibieron docetaxel/cisplatino y aquellos con niveles altos docetaxel/gemcitabina.

En 78 de los 444 pacientes incluidos en este estudio no fue posible analizar los niveles de expresión de ERCC1, razón por la cual estos pacientes fueron excluidos antes de recibir tratamiento.

De los 366 pacientes analizados la mayoría son del sexo masculino (83,6%) y sólo hay 60 mujeres (16,4%). La edad media de los mismos es de 61 años con un rango de 33 a 81 años. Por estadio clínico quirúrgico 338 (92,3%) de los pacientes se encontraban en estadio IV y sólo 28 (7,7%) pacientes en estadio III B con derrame pleural.

El estadio histológico muestra un predominio adenocarcinoma (50,5), seguido de carcinoma escamoso (28,1%), carcinoma de células grandes (12,6%), carcinoma bronquio alveolar (1,9%) y el resto de los casos otras histologías (6,8 %).

Con respecto al ECOG PS del paciente, la mayoría de los mismos presentaban en el momento del diagnóstico performance status de 1 (63,4%).

Se observaron diferencias significativas en la tasa de respuesta entre los pacientes incluidos en el brazo control y el brazo genotípico (37,6% vs 47,5%; $p=0,032$). Al momento de realizar el análisis, 324 de los 366 pacientes incluidos en el estudio habían progresado o muerto. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia. La supervivencia media fue de 9,8 meses en el brazo control versus 9,9 meses en el brazo genotípico ($p=0.59$). La supervivencia media para los pacientes con baja expresión de ERCC1 fue de 10,4 meses y de 9,5 meses para aquellos con altos niveles de expresión de ERCC1.

4.2 Objetivo 1: “Estudiar el estado de metilación de *CHFR* en ADN tumoral circulante de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado”

4.2.1 Análisis del estado de metilación de *CHFR* en suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado

Se analizó el estado de metilación de *CHFR* en el suero de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado mediante la técnica de MS-PCR. Primeramente, se extrajo el ADN tumoral circulante proveniente del suero de los pacientes. Tras la modificación con bisulfito de sodio, se amplificó la región promotora empleando cebadores específicos para la reacción de MS-PCR. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

De los 366 pacientes incluidos en el estudio fue posible realizar el análisis de la metilación de *CHFR* sólo en 308 pacientes debido a que no se disponía de suero de los restantes pacientes. 100 de los 308 pacientes analizados (32,4%) presentaron metilación en la zona promotora del gen de *CHFR*. En algunos casos se observó la amplificación de ambos alelos, quizás debido a la contaminación con ADN normal circulante o de casos de metilación hemicigota.

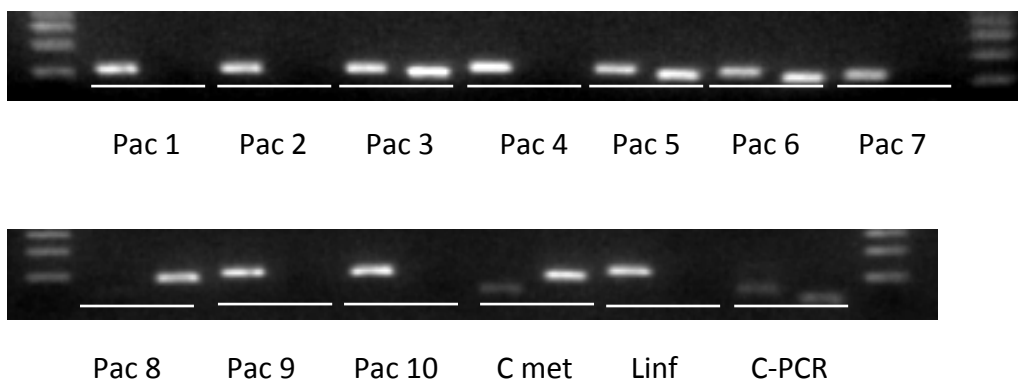


Figura 16: MSP de suero de los pacientes de cáncer de pulmón analizadas y sus correspondientes controles; Met: DNA Universal metilado (Chemicon); linf: DNA de linfocitos de sangre periférica de controles sanos; C-PCR: control negativo de PCR

4.2.2 Correlación entre las características clínicas de los pacientes y el estado de metilación de *CHFR*

Como se puede observar en la Tabla 8 no existe una diferencia significativa entre el estado de metilación de los pacientes analizados y las diferentes características clínicas evaluadas, a excepción de respuesta de la respuesta.

		Metilados	No metilados	p
	N=308	100	208	
Sexo				0,52
	Masculino	81(31,6)	175 (68,4)	
	Femenino	19 (36,5)	33(63,5)	
Edad (rango medio)		60 (37-77)	62 (33-81)	
ECOG PS				0,21
	0	44 (37,0)	75 (63,0)	
	1	56 (29,6)	133 (70,4)	
Histología				0,82
	Adenocarcinoma	52 (32,9)	106 (67,1)	
	Carcinoma de célula grande	12 (32,4)	25 (67,6)	
	Escamoso	30 (24,1)	58 (65,9)	
	Otras	6 (24,0)	19 (76,0)	
Brazos de tratamiento				0,17
	Control	32 (27,4)	85 (72,6)	
	Experimental	68 (35,6)	123 (64,4)	
Brazos de tratamiento				0,18
	Control	32 (27,4)	85 (72,6)	
	Bajos niveles	44 (38,6)	70 (61,4)	
	Altos niveles	24 (31,2)	53 (68,8)	
Ciclos (rango medio)		6 (1-8)	5 (1-10)	0,60
ERCC1 (Rango medio)		1,47 (0,27-8,32)	1,64 (0,14-11,10)	0,36
Repuesta				0,02
	RC	2 (18,2)	9 (81,1)	
	RP	38 (29,5)	91 (70,5)	
	EE	29 (29,6)	69 (70,4)	
	PE	28 (50,9)	27 (49,1)	
	NE	3 (20,0)	12 (80,0)	
Respuesta				0,14
	RC+RP	40 (28,6)	100 (71,4)	
	EE+PE	57 (37,3)	96 (62,7)	
Segunda líneas de tratamiento				0,72
	Si	52 (33,8)	106 (68,8)	
	No	48(31,2)	102 (66,2)	

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

4.2.3 Correlación entre el estado de metilación de *CHFR* y supervivencia, tiempo a la progresión y respuesta

4.2.3.1 Estado de metilación de *CHFR* y supervivencia

La supervivencia de los 308 pacientes analizados fue de 10,12 meses (95% IC 9,11- 11,11 meses). La supervivencia fue de 10,12 meses (95% IC 7,37-12,86 meses) para el grupo de los pacientes con *CHFR* metilado y de 10,18 meses (95% IC 9,13- 11,24 meses) para el grupo de los pacientes con *CHFR* no metilado ($p=0,63$) (Figura 17)

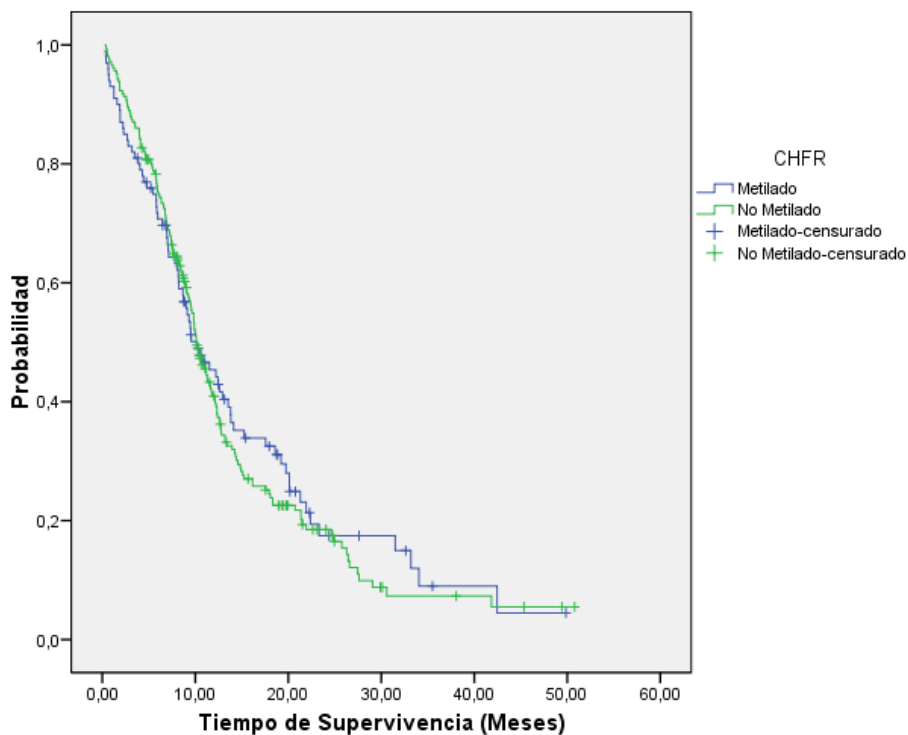


Figura 17: Kaplan-Meier de supervivencia para los pacientes analizados de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

Mediante el análisis de regresión univariable sólo el ECOG PS aparece como factor pronóstico asociado a mejor supervivencia. Las mismas variables fueron posteriormente analizadas de forma conjunta mediante una regresión Cox multivariable. El ECOG PS continúa siendo el único factor pronóstico asociado a mejor supervivencia en este grupo de pacientes, es decir que aquellos pacientes con mejor ECOG PS presentan menor riesgo de muerte (Tabla 9).

Resultados

		N	Univariable HR (95% C.I)	P	Multivariable HR (95% C.I)	P
CHFR						
	Metilado	100	0,94(0,71-1,23)	0,64	1,05(0,79-1,40)	0,72
	No metilado	208	1		1	
Sexo						
	Masculino	256	1,36(0,95-1,94)	0,09	1,35(0,93-1,96)	0,11
	Femenino	52	1		1	
Edad						
	Menor o igual a 66 años	112	1	0,39	1	0,45
	Mayor a 66 años	196	0,89 (0,68-1,16)		0,90 (0,68-1,18)	
Histología						
	Adenocarcinoma	158	0,63(0,40-1,01)	0,05	0,65(0,41-1,05)	0,08
	Carcinoma de célula grande	37	0,76(0,44-1,34)	0,35	0,74(0,42-1,31)	0,31
	Carcinoma escamoso	88	0,78(0,48-1,28)	0,33	0,72(0,44-1,18)	0,19
	Otros	25	1		1	
ECOG PS						
	0	119	0,57(0,43-0,75)	<0,001	0,56(0,43-0,75)	<0,001
	1	189	1		1	
Brazos de tratamiento						
	Control	117	1,04(0,77-1,40)	0,80	1,02(0,75-1,38)	0,98
	Bajos niveles	114	1		1	
	Altos niveles	77	1,36(0,98-1,88)	0,07	1,39(0,99-1,95)	0,06

Tabla 9: Análisis univariable y multivariable para la supervivencia de los 308 pacientes analizados.

4.2.3.2 Estado de metilación de *CHFR* y tiempo a la progresión

El tiempo a la progresión para los 308 pacientes analizados fue de 5,98 meses (95% IC 5,11 - 6,85 meses). El tiempo a la progresión fue de 5,46 meses (95% IC 3,60- 7,30 meses) para el grupo con *CHFR* metilado y de 6,28 meses (95% IC 5,37- 7,19 meses) para el grupo de pacientes con *CHFR* no metilado ($p=0.78$) (Figura 18).

Resultados

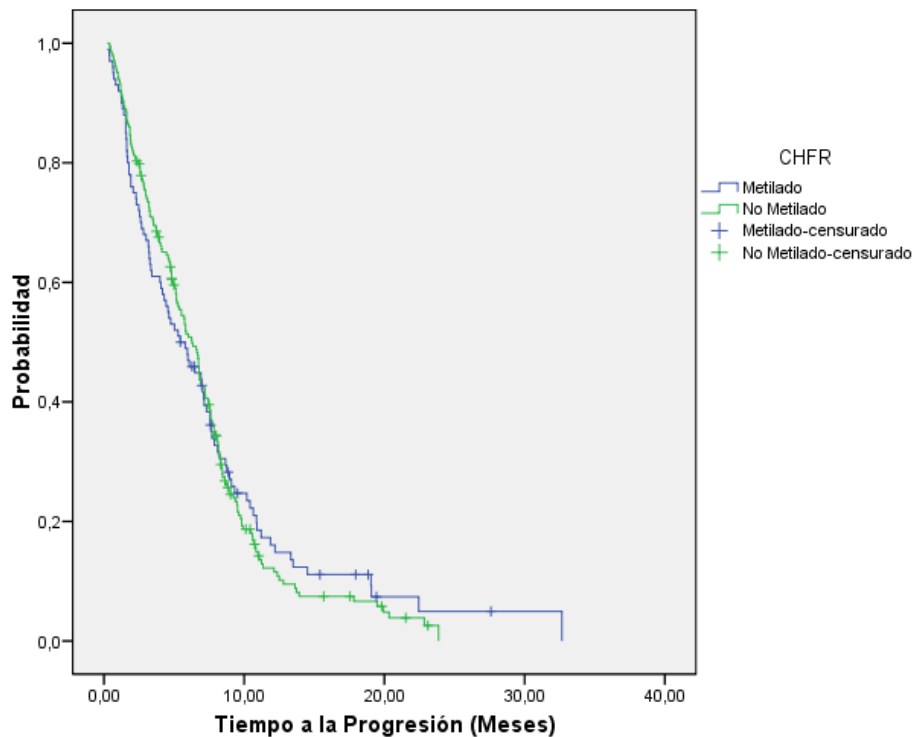


Figura 18: Kaplan-Meier de tiempo a la progresión para los pacientes de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

El análisis de regresión univariable Cox mostró que la edad, el ECOG PS y el brazo de tratamiento de bajos niveles de expresión de ERCC1 correlacionan significativamente con el tiempo a la progresión. Tras realizar un análisis multivariable se confirmó a estas variables como factores pronósticos independientes para el tiempo a la progresión (Tabla 10). De acuerdo a ello, los pacientes mayores de 66 años presentan un menor riesgo de progresión, al igual que los pacientes con mejor ECOG PS y por el contrario, aquellos incluidos en el grupo de tratamiento con elevados niveles de ERCC1 presentan el mayor riesgo de progresión.

Resultados

		N	Univariable HR (95% C.I)	P	Multivariable HR (95% C.I)	P
CHFR						
	Metilado	100	0,97(0,75-1,25)	0,79	1,12(0,86-1,46)	0,41
	No metilado	208	1		1	
Sexo						0,59
	Masculino	256	1,12(0,82-1,54)	0,48	1,10(0,78-1,54)	
	Femenino	52	1		1	
Edad						
	Menor o igual a 66 años	112	1	0,05	1	0,05
	Mayor a 66 años	196	0,78 (0,60-0,99)		0,77(0,60-1,01)	
Histología						
	Adenocarcinoma	158	0,68(0,44-1,07)	0,09	0,70(0,44-1,10)	0,12
	Carcinoma de célula grande	37	0,71(0,41-1,22)	0,22	0,70(0,41-1,21)	0,20
	Carcinoma escamoso	88	0,91(0,58-1,45)	0,70	0,93(0,58-1,48)	0,74
	Otros	25	1		1	
ECOG						
	0	119	0,54(0,42-0,69)	<0,001	0,56 (0,43-0,73)	<0,001
	1	189	1		1	
Brazos de tratamiento						
	Control	117	1,33(1,01-1,76)	0,04	1,33(1,01-1,77)	0,05
	Bajos niveles	114	1		1	
	Altos niveles	77	1,28(0,94-1,75)	0,12	1,35(0,98-1,87)	0,07

Tabla 10: Análisis univariable y multivariable para el tiempo a la progresión de los 308 pacientes analizados.

4.2.3.3 Estado de metilación de *CHFR* y respuesta al tratamiento

De los 308 pacientes analizados 11 (3,6%) presentaron respuesta completa, 129 (41,9%) respuesta parcial, 98 (31,8%) enfermedad estable, 55 (17,9%) progresaron y 15 (4,9%) resultaron ser no evaluables.

Tabla 11 se muestra el tipo de respuesta en función de las distintas variables analizadas.

Resultados

	N	EE+PE	N	RC+RP	p
CHFR					0,14
Metilado	57	37,3%	40	28,6%	
No metilado	96	62,7%	100	71,4%	
Sexo					0,99
Masculino	126	82,4%	116	82,9%	
Femenino	27	17,6%	24	17,1%	
Histología					0,92
Adenocarcinoma	76	49,7%	75	53,6%	
Carcinoma de célula grande	18	11,8%	16	11,4%	
Carcinoma escamoso	46	30,1%	38	27,1%	
Otros	13	8,5%	11	7,9%	
ECOG					0,004
0	48	31,4%	67	47,9%	
1	105	68,6%	73	52,1%	
Brazos de tratamiento					0,06
Control	68	44,4%	44	31,4%	
Bajos niveles	35	22,9%	36	25,7%	
Altos niveles	50	32,7%	60	42,9%	

Tabla 11: Respuesta y características clínicas de los pacientes analizados

Tras realizar el análisis de regresiones logísticas para respuesta, el ECOG PS y el brazo de tratamiento aparecen como variables asociadas a la respuesta. De dicho análisis se infiere los pacientes con mejor ECOG PS y aquellos incluidos en el brazo de tratamiento con bajos niveles de expresión de ERCC1 presentan mejor respuesta al tratamiento (Tabla 12)

Resultados

		N	Univariable HR (95% C.I.)	P	Multivariable HR (95% C.I.)	P
CHFR	Metilado	97	0,67(0,41-1,10)	0,12	0,61(0,37-1,03)	0,06
	No metilado	196	1		1	
Sexo	Masculino	242	1,04(0,57-1,90)	0,91	1,12(0,59-2,14)	0,74
	Femenino	51	1		1	
Edad	Menor o igual a 66 años	189	1		1	
	Mayor a 66 años	104	1,46 (0,90-2,36)	0,12	1,43 (0,86-2,39)	0,17
Histología	Adenocarcinoma	151	1,17(0,49-2,77)	0,92	1,12(0,46-2,74)	0,80
	Carcinoma de célula grande	34	1,05(0,37-2,99)	0,93	1,14(0,39-3,38)	0,81
	Carcinoma escamoso	84	0,98(0,39-2,43)	0,96	0,90(0,35-2,35)	0,84
	Otros	24	1		1	
ECOG	0	115	2,01(1,25-3,23)	0,004	2,03(1,24-3,33)	0,005
	1	178	1		1	
Brazos de tratamiento	Control	112	0,54(0,32-0,92)	0,02	0,50(0,29-0,88)	0,02
	Bajos niveles	110	1		1	
	Altos niveles	71	0,86(0,47-1,56)	0,61	0,86(0,46-1,61)	0,64

Tabla 12: Regresiones logísticas univariadas y multivariadas para respuesta de los pacientes evaluables (sólo 293 pacientes evaluables para respuesta)

4.2.3.4 Estado de metilación y supervivencia en respondedores

Posteriormente se analizó la supervivencia en los 140 pacientes que presentaron respuestas completas y parciales de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*. En este caso, la supervivencia fue de 21,29 meses (95% IC 28,36-14,22 meses) para el grupo de los pacientes con *CHFR* metilado y de 13,42 meses (95% IC 15,49-11,35 meses) para el grupo de los pacientes con *CHFR* no metilado ($p=0,05$) (Figura 19).

Resultados

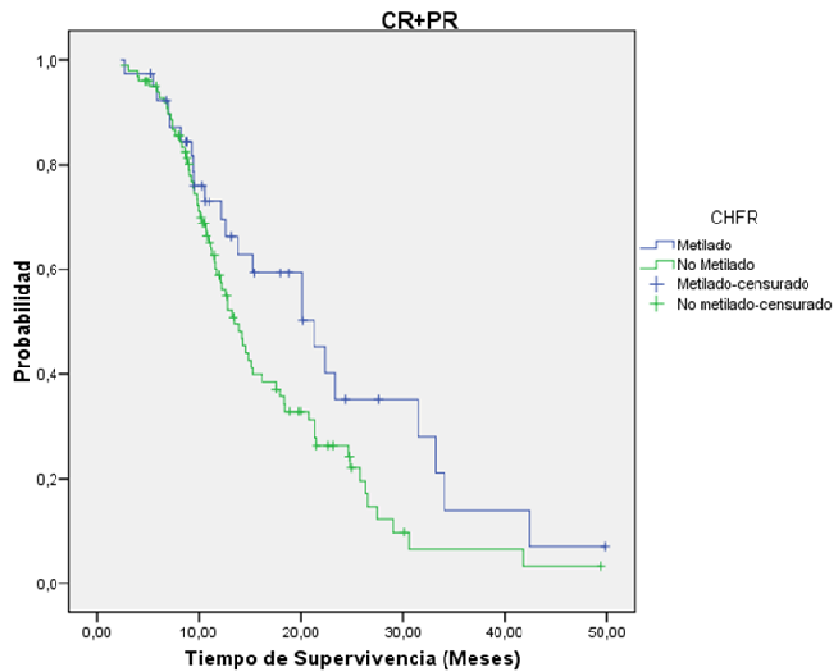


Figura 19: Kaplan-Meier de supervivencia para los pacientes con respuesta al tratamiento de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

4.2.4 Subgrupo de pacientes que se beneficiarían de una quimioterapia individualizada

Cuando se analizó la supervivencia de acuerdo a la edad y el estado de metilación de *CHFR*, se pudo observar que los pacientes mayores de 66 años con *CHFR* metilado alcanzaron una supervivencia de 17,55 meses (95% IC 5,32-29,79) comparado con 10,94 (95% IC 8,79-13,09) para pacientes mayores de 66 años con *CHFR* no metilado, con una significancia estadística de 0,02. En cambio, para el grupo de pacientes menores de 66 años la supervivencia para los pacientes *CHFR* metilado fue de 9,45 meses (95% IC 7,49-11,42) y de 10,02 (95% IC 9,26- 10,77) para los pacientes con *CHFR* no metilado, no presentando diferencia significativa en la supervivencia (Figura 20).

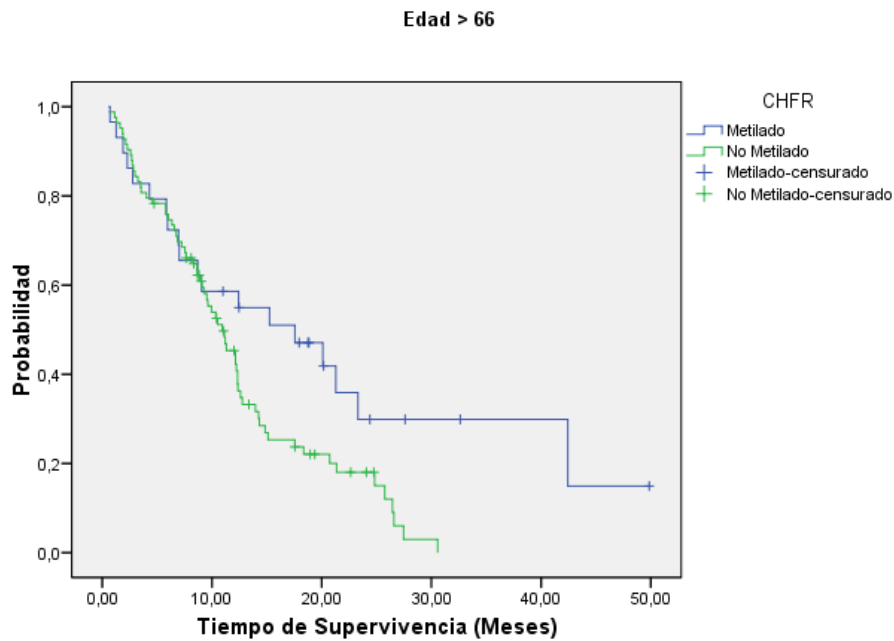


Figura 20: Kaplan-Meier de supervivencia para los pacientes mayores de 66 años de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

Al analizar el tiempo a la progresión en estos subgrupos de pacientes también se observaron diferencias significativas para el subgrupo de pacientes mayores de 66 años. El tiempo a la progresión para aquellos pacientes mayores de 66 con *CHFR* metilado fue de 8,23 meses (95%IC 2,46-14,01) en comparación con 7,21 meses (95%IC 6,46-7,96) para aquellos pacientes mayores de 66 con *CHFR* no metilado, con una diferencia significativa de 0,04. Cuando se evaluó el tiempo a la progresión en el subgrupo de pacientes menores de 66 años, no se hallaron diferencias significativas entre el subgrupo de pacientes con *CHFR* metilado y aquellos con *CHFR* no metilado (Figura 21).

Resultados

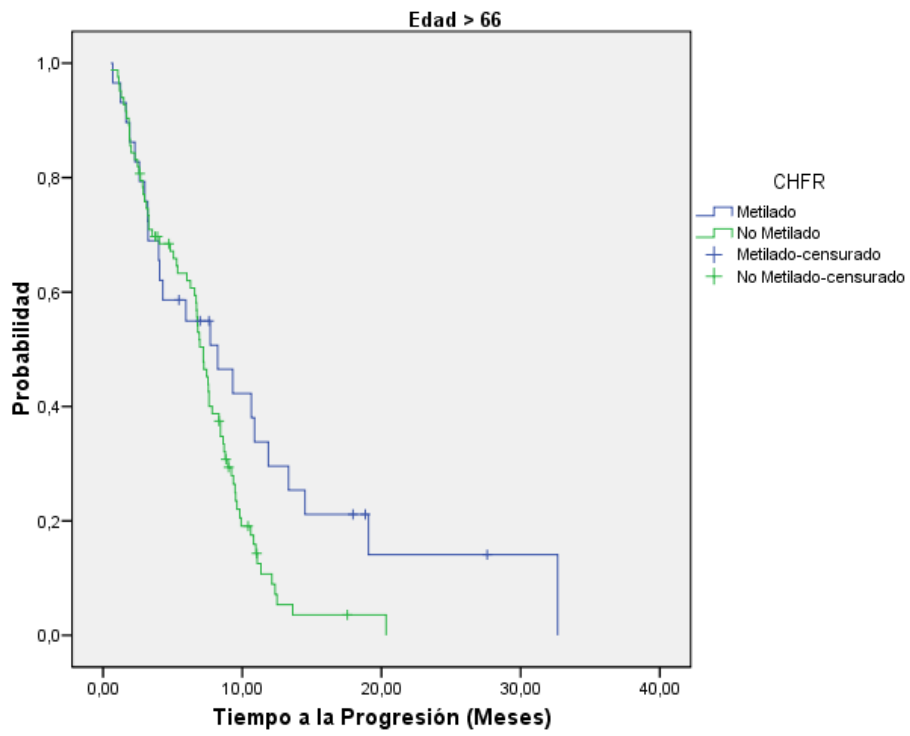


Figura 21: Kaplan-Meier del tiempo a la progresión para los pacientes mayores de 66 años de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*

4.3 **Objetivo 2:** “Estudiar la influencia de segundas líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado”

4.3.1 **Análisis de las características clínicas y moleculares de los pacientes según hayan recibido o no segunda línea de tratamiento**

De los 366 pacientes analizados, 187 no recibieron segunda línea de tratamiento. Como se puede observar en la tabla que se muestra a continuación, no existe una diferencia significativa entre los pacientes que recibieron o no segundas líneas de tratamiento y las diferentes características clínicas y moleculares evaluadas, a excepción de la edad.

	Segunda línea de tratamiento N(%)	No segunda línea de tratamiento N(%)	p
N=308	179	187	
Sexo			0,48
Masculino	147 (82,1)	159 (85,0)	
Femenino	32 (17,9)	28 (15,0)	
Edad (rango medio)	60 (33-78)	63 (37-81)	0,003
ERCC1 (Rango medio)	1,65 (0,14-13,40)	1,65 (0,32-11,94)	0,29
ECOG PS			0,13
0	73 (40,8)	61 (32,6)	
1	106 (59,2)	126 (67,4)	
Histología			0,14
Adenocarcinoma	101 (56,4)	91 (48,7)	
Carcinoma escamoso	49 (27,4)	54 (28,9)	
Carcinoma de célula grande	22 (12,3)	24 (12,8)	
Otras	7 (3,9)	18 (9,6)	
Primera línea de tratamiento			0,55
Docetaxel/Cisplatino	135 (75,4)	135 (72,2)	
Docetaxel/Gemcitabina	44 (24,6)	52 (27,8)	
Brazos de tratamiento			0,15
Control	78 (43,6)	63 (33,7)	
Bajos niveles	57 (31,8)	72 (38,5)	
Altos niveles	44 (24,6)	52 (27,8)	
CHFR †			0,72
Metilado	52 (33,8)	48 (31,2)	
No metilado	102 (66,2)	106 (68,8)	
Respuesta a la 1ª línea de tratamiento •			0,95
RC+RP	81 (45,5)	79 (47,0)	
EE	63 (35,4)	57 (33,9)	
PE	34 (19,1)	32 (19,0)	

†Solo para los 308 en los que fue posible realizar el análisis.

•Sólo en 346 pacientes en los que fue posible realizar el análisis

Tabla 13: Características de todos los pacientes que recibieron o no segundas líneas de tratamiento

Resultados

De los 179 pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento, 105 recibieron sólo quimioterapia, 44 recibieron quimioterapia e inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKIs) y 30 pacientes solo recibieron inhibidores de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKIs).

De los 44 pacientes que recibieron tratamiento combinado en segunda línea, la mayoría recibió tres o cuatro líneas de tratamiento. Los EGFR TKIs fueron administrados como segunda o tercera línea de tratamiento.

Se observaron diferencias significativas en algunas de las características clínicas evaluadas en los pacientes tratados en segunda línea con quimioterapia y con inhibidores del dominio tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico. La mayoría de las mujeres y adenocarcinomas recibieron tratamiento en segunda línea con EGFR TKIs, mientras que la mayoría de los pacientes recibieron tratamiento quimioterápico en segunda línea antes de los tres meses de haber recibido el primer tratamiento. No se observaron diferencias significativas para el ECOG PS, la primera línea de tratamiento, los niveles de ERCC1, la metilación de *CHFR* ni la respuesta a la primera línea de tratamiento (Tabla 14)

Resultados

		Segunda línea de tratamiento		p
		Quimioterapia N(%)	EGFR TKIs N(%)	
N=179		105	74	
Sexo				0,03
	Masculino	92 (87,6)	55 (74,3)	
	Femenino	13 (12,4)	19 (25,7)	
Edad (rango medio)		59 (34-78)	59 (33-78)	0,93
ERCC1 (Rango medio)		1,65 (0,32-11,94)	1,65 (0,14-13,40)	0,69
ECOG PS				0,99
	0	43 (41,0)	30 (40,5)	
	1	62 (59,0)	44 (59,5)	
Histología				0,03
	Adenocarcinoma	52 (49,5)	49 (66,2)	
	No adenocarcinoma	53 (50,5)	25 (33,8)	
Primera línea de tratamiento				0,99
	Docetaxel/Cisplatino	79 (75,2)	56 (75,7)	
	Docetaxel/Gemcitabina	26 (24,8)	18(24,3)	
Brazos de tratamiento				0,89
	Control	47 (44,7)	31 (41,9)	
	Bajos niveles	32 (30,5)	25 (33,8)	
	Altos niveles	26 (24,8)	18 (24,3)	
CHFR †				0,73
	Metilado	32 (35,2)	20 (31,7)	
	No metilado	59 (64,8)	43 (68,3)	
Respuesta a la 1ª línea de tratamiento •				0,65
	Respondedores	49 (47,1)	32 (43,2)	
	No respondedores	55 (52,9)	42 (56,8)	
Tiempo entre la primera y segunda línea de tratamiento				0,04
	Menso o igual a 3 meses	62 (59,0)	33 (45,2)	
	Entre 3 y 6 meses	21 (20,0)	12 (16,4)	
	Mayor o igual a 6 meses	22 (21,0)	28,(38,4)	

†Solo para los pacientes en los que fue posible realizar el análisis.

•Sólo 178 pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento fueron evaluados en la respuesta a la primera línea de tratamiento en el estudio inicial.

Tabla 14: Características de los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento de acuerdo al tipo de segunda línea recibida

4.3.2 Importancia del tratamiento en segunda línea en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico

La supervivencia media de los pacientes que recibieron una segunda línea de tratamiento fue de 13,4 meses, en contraposición de 6,9 meses para aquellos pacientes que no recibieron segunda línea de tratamiento ($p < 0,0001$). A su vez, para los pacientes tratados en segunda línea, la supervivencia media de los que recibieron quimioterapia fue de 10,8 meses y de 19,0 meses para los que recibieron inhibidores del dominio tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico, $p = 0,0002$.

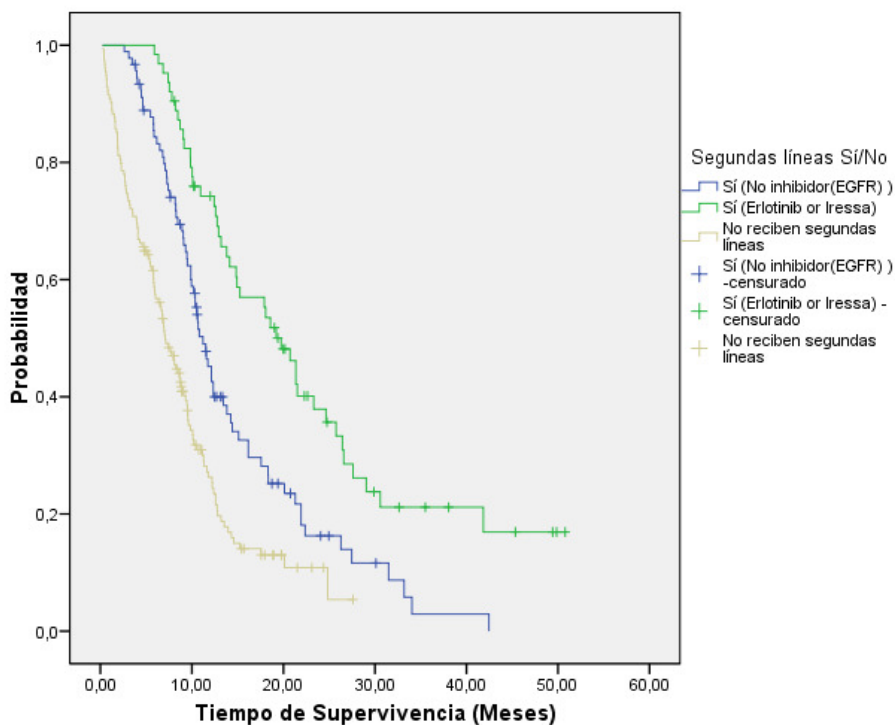


Figura 22: Supervivencia global de los pacientes sin tratamiento en segunda línea, tratados en segunda línea con quimioterapia y tratados en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico

4.3.3 Supervivencia de los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento de acuerdo a las características clínicas y moleculares

Se analizó también la supervivencia de los pacientes tratados en segunda línea según el tipo de tratamiento recibido y las características clínicas y moleculares de los pacientes y el tipo de quimioterapia recibida en primera línea. En general, los pacientes que recibieron en segunda línea inhibidores de dominio tirosina quinasa de receptor de crecimiento epidérmico presentaron una mejor supervivencia.

Los pacientes que en primera línea recibieron docetaxel/cisplatino y en segunda línea inhibidores de dominio tirosina quinasa de receptor de crecimiento epidérmico mostraron una supervivencia de 19,2 meses (95% CI 15,2-23,2) mientras que aquellos que recibieron el mismo esquema en primera línea pero quimioterapia en segunda línea mostraron una supervivencia de tan solo 10,7 meses (95% CI 8,5-12,9) con una significancia estadística de 0,0002. Sin embargo, en los pacientes tratados en primera línea con docetaxel/gemcitabina no observó diferencia significativa en la supervivencia con respecto a la segunda línea de tratamiento empleada.

La supervivencia para los pacientes que no presentaron hipermetilación de la zona promotora de *CHFR* tratados en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico fue de 21,4 meses (95% CI 16,7-26,0) y de tan sólo 11,2 meses (95 % 9,7-2,7) para aquellos tratados con quimioterapia en segunda línea ($p=0.0001$). Sin embargo, no se observó diferencia significativa en la supervivencia de aquellos pacientes con hipermetilación de *CHFR* y el tipo de segunda línea de tratamiento empleado.

En la Tabla 15 se muestra con más detalle la supervivencia de los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento según las características clínicas y moleculares y el tipo de segunda línea recibida.

Resultados

		Segunda línea de tratamiento				
		Quimioterapia		EGFR TKIs		p
		N	Supervivencia Meses (95% CI)	N	Supervivencia Meses (95% CI)	
Nº de pacientes (%) y supervivencia global		105(58,7%)	10,8 (9,4-12,2)	74 (41,3%)	19,0 (14,5-23,4)	0,0002
Sexo						
	Masculino	92	10,68 (9,31-12,05)	55	15,24 (9,47-21,01)	0,002
	Femenino	13	13,82 (8,23-19,41)	19	19,74 (15,57-23,09)	0,04
ECOG PS						
	0	43	12,33 (9,47-15,19)	30	21,36 (15,67-27,04)	0,02
	1	62	10,55 (9,12-11,97)	44	16,66 (10,57-22,75)	0,005
Punto de corte de Edad						
	Menor o igual a 60 años	54	10,55 (8,99-12,11)	36	16,66 (12,69-20,63)	0,008
	Mayor de 60 años	51	12,13 (10,35 -13,91)	38	21,36 (14,32-28,39)	0,008
Histología						
	Adenocarcinoma	52	10,35 (8,10-12,59)	49	19,74 (16,38-23,09)	<0,0001
	No adenocarcinoma	53	11,21 (9,40-13,01)	25	14,84 (11,12-18,57)	0,53
Mejor respuesta a primera línea de quimioterapia						
	RC+ RP	49	14,25 (11,12-17,38)	32	21,52 (18,51-24,53)	0,02
	EE	30	10,35 (7,54-13,16)	33	28,05 (12,00-24,09)	0,03
	PE	25	6,94 (6,07-7,81)	9	10,02 (3,55-16,49)	0,20
Tiempo entre primera y segunda línea de tratamiento						
	Menor o igual a 3 meses	62	8,46 (6,98-9,95)	33	12,43 (8,90-15,96)	0,01
	Entre 3 y 6 meses	21	12,33 (9,96-14,70)	12	17,92 (7,54-28,30)	0,22
	Mayor o igual a 6 meses	22	21,92 (18,90-24,93)	28	30,58 (22,90-38,26)	0,03
Primera línea de tratamiento*						
	Docetaxel/Cisplatino	79	10,68 (8,45-12,91)	56	19,21 (15,23-23,18)	0,0002
	Docetaxel/Gemcitabina	26	10,84 (9,64-12,05)	15	14,84 (10,69-19,00)	0,029
CHFR †						
	Metilado	32	11,50 (6,21-16,79)	20	14,12 (6,23-22,01)	0,21
	No metilado	59	11,21 (9,70-12,71)	43	21,36 (16,71-26,01)	0,0001

†Solo para los pacientes en los que fue posible realizar el análisis.

*Sólo 178 pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento fueron evaluados en la respuesta a la primera línea de tratamiento en el estudio inicial.

Tabla 15: Supervivencia media para los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento de acuerdo a las características clínicas u moleculares y el tipo de primera línea de tratamiento recibida

4.3.4 Identificación de factores pronóstico para la supervivencia en pacientes tratados en segunda línea

En el análisis univariable de todos los pacientes solo el ECOG PS y el tipo de segunda línea de tratamiento empleada aparecieron como factores pronóstico para la supervivencia.

Con la finalidad de evaluar el efecto de recibir una segunda línea de tratamiento en la supervivencia media, se llevó a cabo un análisis multivariable en el que se incluyeron todas las variables analizadas en el análisis univariable. Nuevamente el ECOG PS y el tipo de segunda línea de tratamiento empleada aparecieron como únicos factores pronóstico para la supervivencia.

Estos resultados se muestran a continuación en la Tabla 16.

Resultados

		Univariable		Multivariable	
		Hazard Ratio (95% CI)	p	Hazard Ratio (95% CI)	p
Tipo de segunda línea de tratamiento					
	EGFR TKIs	1(ref)		1(ref)	
	Quimioterapia	1,80 (1,27-2,56)	0,001	1,81 (1,23-2,69)	0,003
	Sin segunda línea de tratamiento	3,57 (2,57-4,97)	<0,0001	3,90 (2,66-5,73)	<0,0001
Sexo					
	Masculino	1,31 (0,94-1,81))	0,11	1,21 (0,84-1,76)	0,31
	Femenino	1(ref)		1(ref)	
ECOG PS					
	0	1(ref)		1(ref)	
	1	1,78 (1,38-2,29)	<0,001	2,03 (1,53-2,70)	<0,001
Valor de corte para la edad					
	Menos o igual a 60 años	0,99 (0,79-1,26)	0,96	1,08 (0,83-1,41)	0,57
	Mayor de 60 años	1(ref)		1(ref)	
Histología					
	Adenocarcinoma	1(ref)		1(ref)	
	No adenocarcinoma	1,23 (0,97-1,55)	0,08	1,09 (0,83-1,43)	0,53
CHFR					
	Metilado	1(ref)		1(ref)	
	No metilado	1,07 (0,81-1,41)	0,64	0,97 (0,73-1,28)	0,82
Brazos de tratamiento					
	Control	1,04 (0,79-1,36)	0,79	1,17 (0,86-1,59)	0,32
	Niveles bajos	1(ref)		1(ref)	
	Niveles altos	1,31 (0,97-1,77)	0,08	1,34 (0,96-1,88)	0,90

Tabla 16: Análisis univariable y multivariable de la supervivencia en todos los pacientes (N=366)

Resultados

Se realizó el análisis multivariable de los 179 pacientes tratados en segunda línea de tratamiento en el que se incluyeron 8 variables: tipo de segunda línea de tratamiento, histología, ECOG PS, sexo, brazos de tratamiento, tiempo entre la primera y segunda línea de tratamiento, estado de metilación de *CHFR* y edad,

Sólo el tipo de segunda línea de tratamiento y el tiempo transcurrido entre la primera y segunda línea de tratamiento aparecen como factores independientes para la supervivencia. No se halló una asociación significativa entre las variables analizadas y el tipo de segunda líneas empleadas. El uso de inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico y el mayor tiempo entre la primera y la segunda línea de tratamiento fueron identificados como factores asociados a una mejor supervivencia.

En la Tabla 17 se muestran las variables en las que realizó el análisis univariable y multivariable para los 179 pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento.

Resultados

		Univariable		Multivariable		
		Hazard Ratio (95% CI)	p	Hazard Ratio (95% CI)	p ¹	Interacción p ²
Tipo de segunda línea de tratamiento						-
	EGFR TKIs	1(ref)		1(ref)		
	Quimioterapia	1,95 (1,37-2,77)	<0,001	1,85 (1,24-2,78)	0,003	
Sexo						0,92
	Masculino	1,34 (0,85-2,11))	0,22	1,15 (0,68-1,94)	0,60	
	Femenino	1(ref)		1(ref)		
ECOG PS						0,72
	0	1(ref)		1(ref)		
	1	1,34 (0,94-1,90)	0,10	1,11 (0,75-1,63)	0,61	
Valor de corte para la edad						0,35
	Menos o igual a 60 años	1,19 (0,85-1,67)	0,31	1,03 (0,68-1-56)	0,88	
	Mayor de 60 años	1(ref)		1(ref)		
Histología						0,16
	Adenocarcinoma	1(ref)		1(ref)		
	No adenocarcinoma	1,11 (0,79-1,56)	0,55	1,11 (0,75-1,64)	0,62	
CHFR†						0,66
	Metilado	1(ref)		1(ref)		
	No metilado	1,04 (0,70-1,53)	0,86	1,15 (0,74-1,78)	0,53	
Brazos de tratamiento						0,69
	Control	1,01 (0,68-1,50)	0,95	1,02 (0,65-1,58)	0,94	
	Niveles bajos	1(ref)		1(ref)		
	Niveles altos	1,41 (0,89-2,22)	0,14	1,46 (0,85-2,51)	0,17	
Tiempo entre la primera y segunda línea de tratamiento						0,45
	Menos de 3 meses	5,12 (3,28-8,01)	<0,0001	5,85 (3,49-9,82)	<0,0001	
	Entre 3 y 6 meses	2,57 (1,50-4,40)	0,001	2,73 (1,47-5,08)	0,002	
	Mayor o igual a tres meses	1(ref)		1(ref)		

† Solo para los pacientes en los que fue posible realizar el análisis.

¹ Valor p cox

² valores p obtenido cuando cada interacción de covariables por el tipo de segunda línea de tratamiento se ajustó a el modelo multivariable en el que se incluyeron 8 variables

Tabla 17: Análisis Univariable y Multivariable de la supervivencia para los pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento (N=179)

4.4 Objetivo 3: “Examinar en un modelo de líneas celulares de cáncer de pulmón el efecto del tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib”

4.4.1 Análisis del estado de metilación de CHFR en líneas celulares

Se analizó el estado de metilación de la región promotora de *CHFR* en un panel de siete líneas celulares de cáncer de pulmón. El ADN tumoral extraído de estas líneas celulares se trató con bisulfito de sodio y el ADN modificado fue empleado como ADN molde para dos reacciones de amplificación.

Por un lado, mediante el empleo de cebadores ubicados por fuera de los islotes CpGs se amplificaron unas 270 pares de bases de la región promotora del gen de *CHFR*. Previa visualización en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, parte del producto de dicha reacción fue secuenciado tal y como se describe en el apartado 3.3.1.6 de Materiales y Métodos.

El mismo ADN modificado proveniente de las siete líneas celulares se empleó también en una reacción de MS-PCR, siguiendo las condiciones establecidas en el apartado 3.3.1.7 de Materiales y Métodos. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Por ninguna de las dos técnicas se identificó hipermetilación en la zona promotora del gen de *CHFR* de las siete líneas de cáncer de pulmón analizadas.

A continuación se muestran algunos ejemplos de los resultados obtenidos del estudio de secuenciación de las líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas y la reacción de MSP de cada una de ellas.

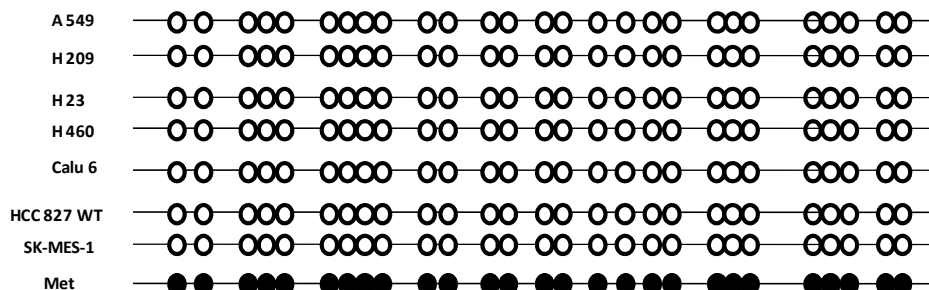


Figura 23: Diagrama esquemático del estado de metilación de los islotes CpG estudiados en la zona promotora de *CHFR*. Los círculos blancos indican no metilado y los negros metilado.

Resultados

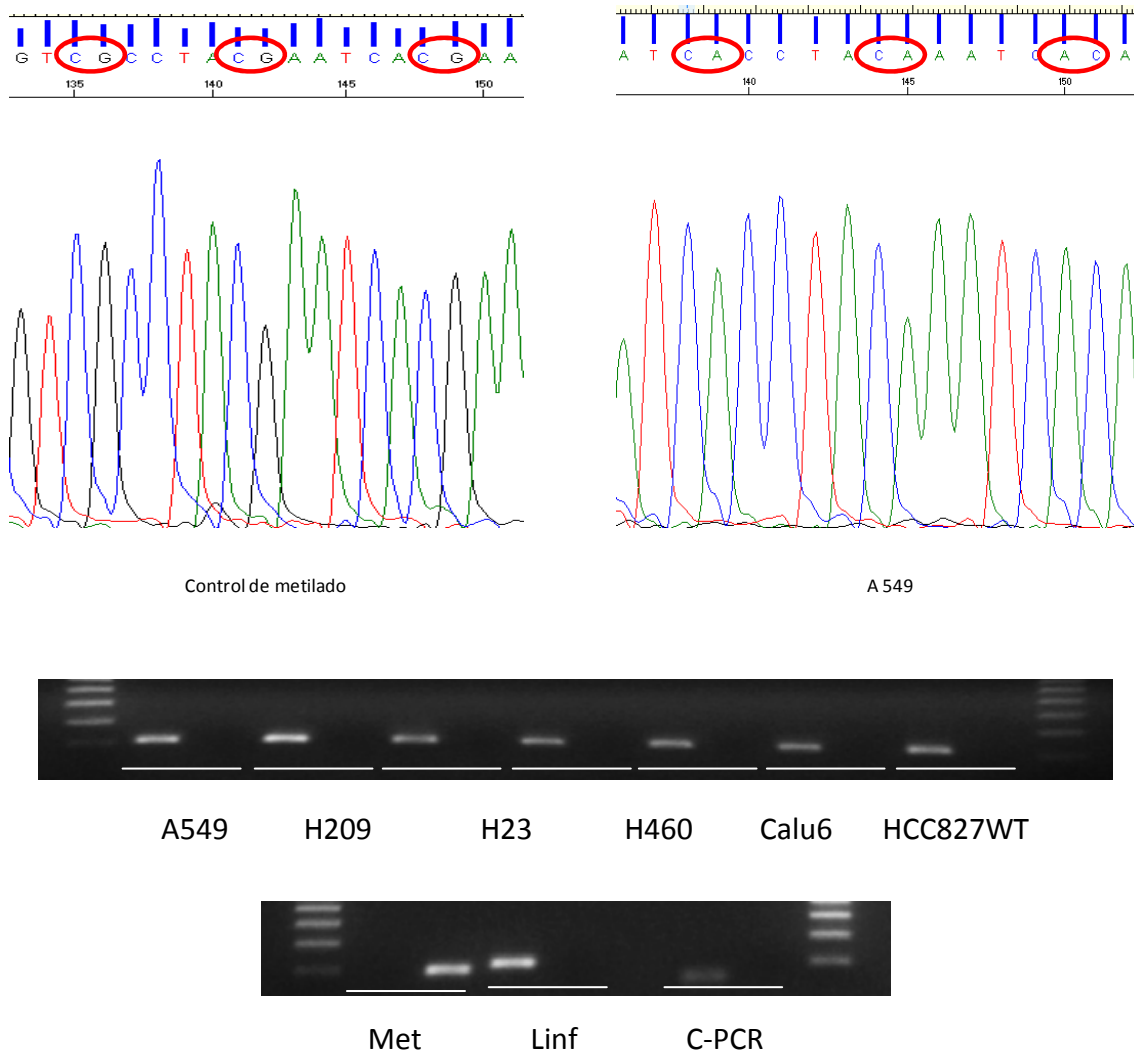


Figura 24: Secuenciación (en reverse) y MSP de las líneas celulares de cáncer de pulmón analizadas y sus correspondientes controles; Met: DNA Universal metilado (Chemicon); linf: DNA de linfocitos de sangre periférica de controles sanos; C-PCR: control negativo de PCR

4.4.2 Expresión de proteína de *CHFR* y *EGFR* en líneas celulares de cáncer de pulmón

La expresión de proteínas de *CHFR* y *EGFR* se analizó en las siete líneas celulares de cáncer de pulmón mediante Western Blotting. Todas las líneas celulares expresaron niveles significativos de *CHFR* a excepción de H209, cuyos niveles de expresión eran prácticamente indetectables a pesar de no encontrarse metilada. La expresión de *EGFR* fue variable en las distintas líneas investigadas, desde la sobreexpresión en A549 a niveles muy bajos en H209 y H23 (Figura 25).

Resultados

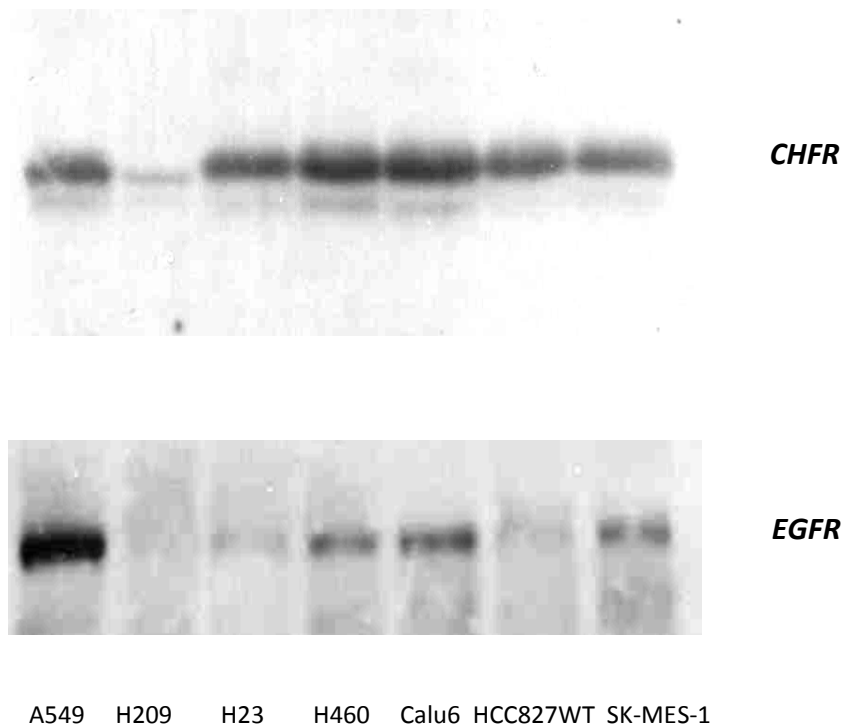


Figura 25: Análisis de expresión de CHFR y EGFR en un panel de 7 líneas de cáncer de pulmón. A excepción de H209, todas las líneas presentan niveles significativos de expresión de *CHFR*. *EGFR* se expresa de manera variable, se observa sobreexpresión en A549 y baja expresión en H209 y H23

En la tabla a continuación se resumen los resultados obtenidos de los estudios de metilación y expresión de *CHFR* en líneas celulares.

Línea celular	Histología	Estado de metilación de CHFR		Expresión de proteínas	
		Secuenciación	MS-PCR	CHFR	EGFR
A549	Adenocarcinoma	No metilado	No metilado	2+	6+
H209	Carcinoma microcítico	No metilado	No metilado	0/1+	0/1+
H23	Adenocarcinoma	No metilado	No metilado	3+	1+
H460	Carcinoma de célula grande	No metilado	No metilado	4+	3+
HCC827 wt	Adenocarcinoma	No metilado	No metilado	3+	0/1+
SK-MES-1	Escamoso	No metilado	No metilado	2+	3+
Calu-6	Carcinoma anaplastico	No metilado	No metilado	4+	4+

Tabla 18: Estudio del estado de metilación de CHFR y expresión de CHFR y EGFR en líneas celulares

4.4.3 Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib y correlación con los niveles de expresión de *CHFR* y *EGFR*

Primeramente se determinó la concentración de la droga necesaria para inhibir el 50% de crecimiento, IC_{50} , para cada droga de forma independiente en cada línea celular.

No pudo hallarse una correlación entre los valores de IC_{50} y los niveles de expresión de *EGFR*. En aquellas líneas celulares con muy bajos niveles de expresión de *EGFR* y altos niveles de expresión de *CHFR*, como H23 y HCC-827 wt, se observó un importante sinergismo. En H209, la única línea celular analizada que presentó una muy baja expresión de *CHFR*, se observó un fuerte antagonismo entre cisplatino y erlotinib. Para el resto de las líneas celulares ambas drogas resultaron sinérgicas; excepto para Calu-6 en la que a niveles inhibitorios bajos se observó una interacción aditiva o un ligero antagonismo (Figura 26).

Línea celular	Histología	IC50 (μ M)		Interacción cisplatino/erlotinib		
		cisplatino	erlotinib	CI (rango)	CI	Descripción
A549	Adenocarcinoma	11	885	0,3-0,9	0,6	Sinergismo fuerte
H209	Carcinoma microcítico	13	474	1,8-4,2	2,8	Antagonismo fuerte
H23	Adenocarcinoma	20	52	0,3-1,0	0,8	Sinergismo moderado
H460	Carcinoma de célula grande	30	180	0,6-1,1	0,8	Sinergismo moderado
HCC827 wt	Adenocarcinoma	22	3,5	0,6-1,0	0,9	Sinergismo leve
SK-MES-1	Escamoso	7	9,3	0,5-0,9	0,7	Sinergismo moderado
Calu-6	Carcinoma anaplastico	0,3	38,4	0,6-1,2	0,9	Sinergismo leve

Tabla 19: Valores de IC_{50} de cada línea celular para cisplatino y erlotinib. Valores de CI tras el tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib

Resultados

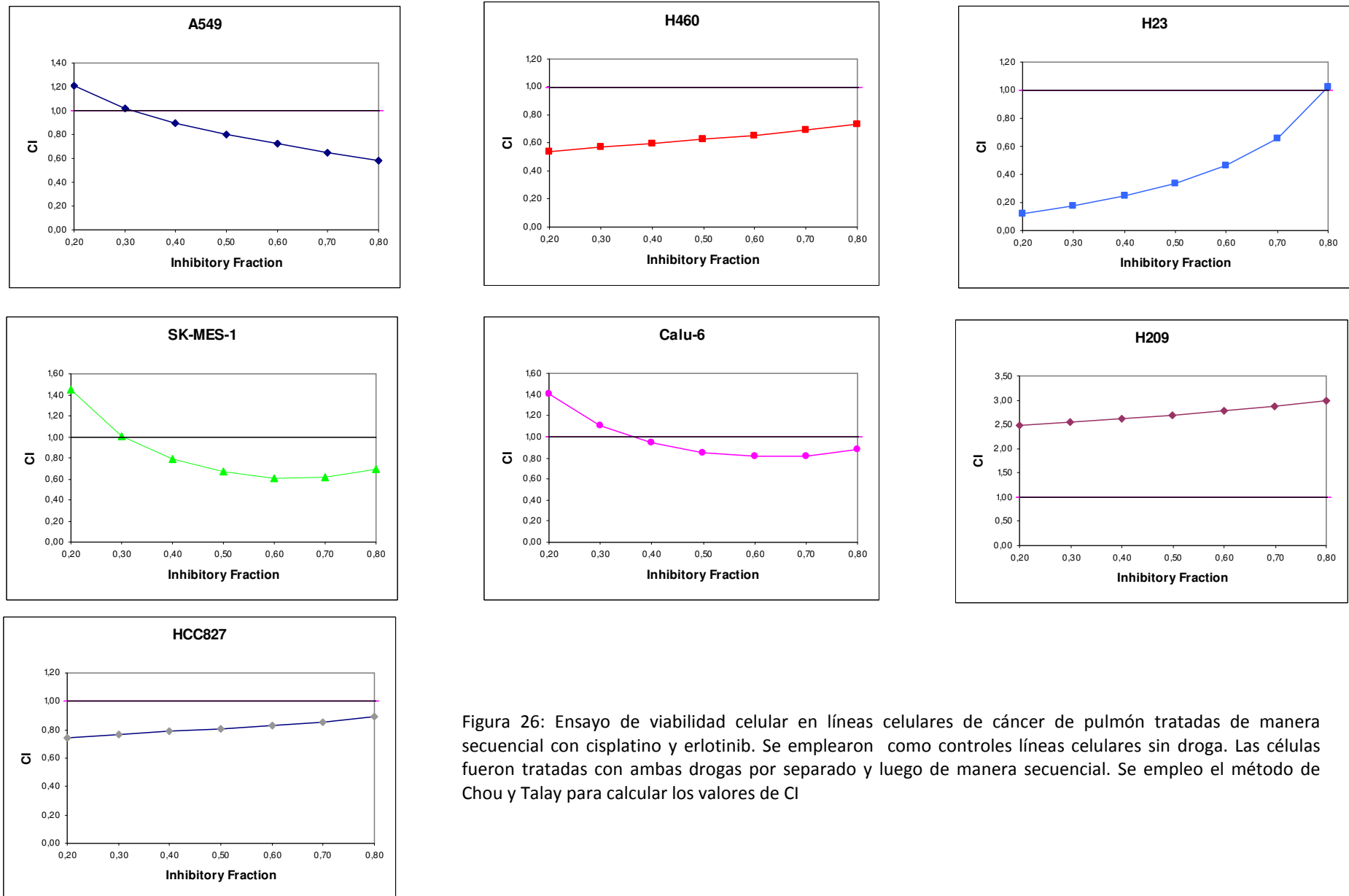


Figura 26: Ensayo de viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de pulmón tratadas de manera secuencial con cisplatino y erlotinib. Se emplearon como controles líneas celulares sin droga. Las células fueron tratadas con ambas drogas por separado y luego de manera secuencial. Se empleó el método de Chou y Talay para calcular los valores de CI

5. DISCUSIÓN

Discusión

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en los países desarrollados y constituye un importante problema sanitario. La supervivencia a 5 años de los pacientes con cáncer de pulmón es de solo el 15%. Aproximadamente el 75% de los casos corresponden a cáncer de pulmón no microcítico, dentro de los cuales la incidencia de los adenocarcinomas está en aumento a nivel mundial como consecuencia de los nuevos aditivos incorporados al tabaco. En general, el 80% de los casos de cáncer de pulmón se asocian al hábito tabáquico y el 20% restante a una combinación de factores ambientales y genéticos [262].

La eficacia del tratamiento depende en gran medida del estadio tumoral, siendo mayor la supervivencia cuando antes se realice el diagnóstico. Este hecho explica la imperiosa necesidad de un diagnóstico precoz mediante la utilización de métodos que resulten rápidos y eficientes. Sin embargo, las nuevas metodologías empleadas en el diagnóstico pueden resultar demasiado costosas o poco sensibles para permitir una detección temprana [263].

El empleo de biomarcadores moleculares representa una alternativa más accesible para la identificación de pacientes de alto riesgo. Los estudios moleculares llevados a cabo hasta el momento permiten evidenciar la presencia de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas en cáncer de pulmón. El hallazgo de ellas en tejido normal y en células pre-neoplásicas demuestra que el proceso oncogénico implica una transformación progresiva de las células epiteliales normales. Así, las diferentes alteraciones moleculares contribuyen al inicio, el desarrollo y la progresión del cáncer de pulmón. El orden cronológico en que sucede la completa transformación del tejido epitelial difiere entre las distintas histologías [190, 264].

En su conjunto estos cambios desencadenan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor. Muchos de estos genes intervienen de manera directa o indirecta en la regulación del ciclo celular. Los genes que forman parte del control de ciclo celular son los responsables de detener el ciclo celular y permitir la reparación del ADN dañado, asegurándose de esta manera que la nueva progenie reciba la información genética correcta.

Hasta el momento muchas de las investigaciones llevadas a cabo en genes que participan en el control del ciclo celular se han centrado en aquellos implicados en la

regulación de la fase G1 del ciclo celular. Estas incluyen la sobre-expresión de ciclinas y ciclinas dependiente de quinasa o de alguno de los sustratos de esta vía de transducción de señales [265].

Sin embargo muy poco se conoce acerca de las implicancias de otras proteínas regulatorias del ciclo celular y su desempeño en la carcinogénesis. Las mutaciones en los genes del control de mitosis (SAC) son relativamente escasas, y en modelos animales la pérdida de expresión de algunos de estos genes resulta incompatible con la vida. Por el contrario, la reducción de la expresión de alguno de ellos conduce a una falla en la correcta separación de los cromosomas, que conlleva al incremento de la inestabilidad cromosómica y favorece el proceso de transformación celular. La expresión de algunos de estos genes, como BUBR1 y MAD2, se ve reducida en muchos tipos tumorales mediante mecanismos epigenéticos [266].

Scolnick y Halazonetis han descrito un nuevo punto de control de ciclo celular, que regula el paso de la metafase a anafase. *CHFR* (Checkpoint with FHA and Ring domain) es el responsable de impedir la condensación cromosómica en respuesta al stress mitótico inducido por los agentes antimicrotúbulos [238]. Muchos de los aspectos relacionados con su mecanismo de acción todavía no han sido esclarecidos. Tras su caracterización, se propuso que *CHFR* actúa como una ubiquitina ligasa capaz de catalizar la degradación de numerosos sustratos y de autoubiquitinizarse en ausencia de éstos, dependiendo para ello de la integridad de su dominio RF [244]. Es a través de este dominio que *CHFR* inhibe la acumulación nuclear de la Ciclina B1 y se impide la activación del complejo Ciclina B1/Cdc2 [246].

Mizuno y colaboradores fueron los primeros en estudiar la falta de expresión de este gen en líneas celulares y tumores primarios de cáncer de pulmón. De sus investigaciones fue posible confirmar la naturaleza epigenética de dicha falta de expresión [253]. Estudios posteriores en los que se profundizó aún más en la naturaleza de la falta de expresión de *CHFR* demostraron que el silenciamiento de dicho gen es el resultado de la hipermetilación aberrante de la región promotora y de la deacetilación de las histonas H3 y H4 [256]. Los análisis desarrollados en líneas celulares y tumores primarios de varios orígenes evidenciaron que dicha inactivación ocurre más específicamente en determinados tipos tumorales, con una frecuencia de entre 10 al 19% para el cáncer de pulmón no microcítico [253, 255, 256].

Discusión

La pérdida de expresión de *CHFR* confiere sensibilidad a los agentes antimicrotúbulos como el docetaxel y el paclitaxel, pero no a aquellos quimioterápicos que actúan provocando daño en el ADN o que inhiben las topoisomerasas [244, 267]. Dado la importancia que se traduce de este hecho, se ha llegado a proponer el desarrollo de pequeñas moléculas inhibitorias del dominio RF, para incrementar la sensibilidad de las células tumorales a agentes antimicrotúbulos [267].

Son numerosas las investigaciones en las que se demuestra la enorme trascendencia del silenciamiento de *CHFR* como posible marcador molecular para el tratamiento de pacientes con distintos tipos tumorales.

Sin embargo, sólo un grupo ha tratado de correlacionar la hipermetilación aberrante de *CHFR* con la respuesta clínica a agentes inhibidores de microtúbulos en cáncer gástrico. El bajo porcentaje de muestras de mucosa gástrica normal que presentaron hipermetilación de *CHFR* confirma que se trata de un evento temprano durante la carcinogénesis. Si bien los resultados no son del todo concluyentes, debido al escaso número de pacientes estudiados, el 86% con *CHFR* metilado presentó regresión o falta de progresión y el 80% con *CHFR* no metilado mostró deterioro progresivo tras el tratamiento con antimicrotúbulos [258].

Todas estas observaciones sentaron la base para la investigar, como primera premisa, el estado de metilación de *CHFR* en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado tratados de acuerdo a los niveles de expresión de ERCC1[268] y su posible influencia como marcador molecular para el tratamiento de estos pacientes.

Es ampliamente conocida la posibilidad de hallar múltiples alteraciones de ADN de origen tumoral en circulación de pacientes con cáncer [148]. El análisis del estado de metilación de *CHFR* en suero es, por tanto, una representación del estado de metilación tumoral y de los niveles de expresión de la proteína para la que codifica dicho gen.

En este trabajo, se procedió al estudio del estado de metilación de *CHFR* en el suero de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Fue posible evaluar el estado de metilación de *CHFR* en suero de 308 de los 366 pacientes incluidos en el estudio, debido a la falta de material para llevar a cabo el análisis de los restantes pacientes. Con

Discusión

la finalidad de evitar posibles contaminaciones del suero con el ADN de células mononucleares, el suero fue centrifugado por duplicado.

La frecuencia de metilación para los pacientes analizados fue de 32,4%. Si bien este valor es mayor al reportado en la bibliografía, en todos los casos se trata de pacientes en estadíos tempranos, sometidos a cirugía o bien de estudios llevados a cabo en líneas celulares de cáncer de pulmón [253, 255]. En un estudio recientemente publicado, el 39,4% de 157 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sometidos a cirugía presentaron pérdida de expresión de *CHFR*. Sin embargo se investigó la correlación de esta pérdida de expresión con la hipermetilación de la zona promotora de este gen en un grupo reducido de sólo 20 pacientes, en los que la frecuencia de dicho evento fue del 15% [269].

De los resultados obtenidos al correlacionar el estado de metilación con la supervivencia o el tiempo a la progresión, en esta primera parte del estudio se desprende una observación interesante.

A pesar de no existir una asociación directa entre la supervivencia de los pacientes analizados y el estado de metilación de *CHFR* en suero, el subgrupo de pacientes mayores de 66 años con *CHFR* metilado presentó una supervivencia significativamente mayor de 17,5 meses comparada con los 10,9 meses para aquellos con *CHFR* no metilado ($p=0,02$) (Figura 20). Al analizar tiempo a la progresión también se hallaron diferencia significativas para el grupo de pacientes mayores de 66 años con *CHFR* metilado (Figura 21). No existiendo diferencia para el grupo de pacientes menores de 66 años ni en supervivencia ni en tiempo a la progresión de acuerdo al estado de metilación de *CHFR*.

Existe una estrecha asociación entre el cáncer y el envejecimiento. Ambos son el resultado un proceso complejo caracterizado por la reducción de la función celular y la incapacidad para mantener la homeostasis tisular, que conduce al incremento de la inestabilidad celular. A pesar de que se ha propuesto que la hipermetilación de *CHFR* es un evento vinculado a la edad en pacientes con cáncer de colon, dicha asociación no se ha descrito para cáncer de pulmón [255].

Discusión

La reducción de algunos de los genes que participan en el SAC se asocia también al envejecimiento celular. Si bien se desconoce el mecanismo exacto a través del cual BUBR1 interviene en la regulación este mecanismo [266], es posible que la reducción concomitante de ambos genes pudiera explicar la supervivencia más prolongada en este grupo de pacientes tratados con inhibidores de microtúbulos.

Recientemente se ha confirmado la importancia de *CHFR* en la regulación de la estabilidad génica y su relación con otras proteínas que intervienen en el SAC. La baja expresión de *CHFR* desencadena la deslocalización de MAD2 y BUBR1 durante la mitosis, provocando una disrupción en la formación del complejo MAD2/CDC20 [270].

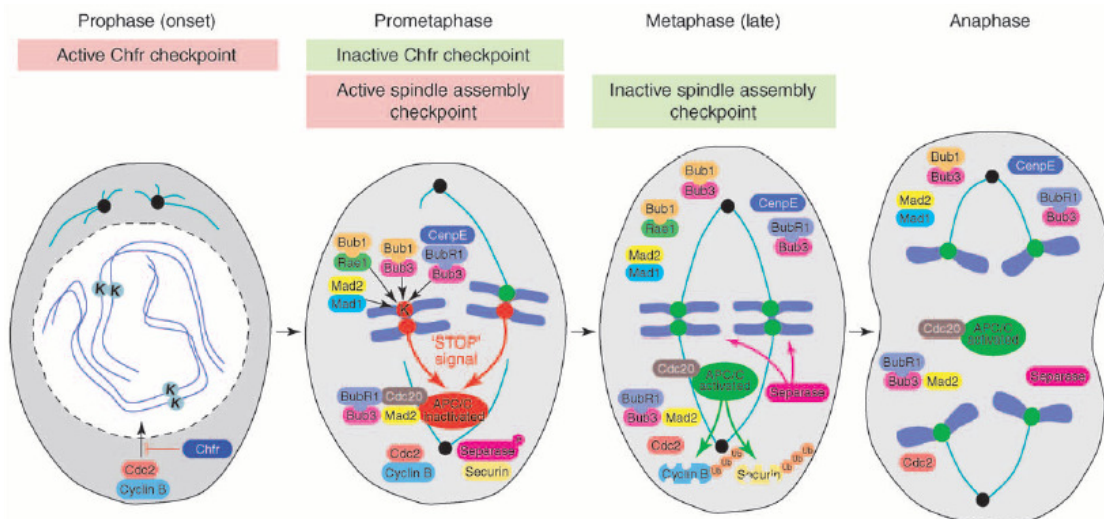


Figura 27: Esquema del control del ciclo celular. El punto de control mediado por CHFR se activa tras la despolimerización provocada por los agentes antimicrotúbulos, provocando una detención en la condensación y separación de los cromosomas. Tras su activación se impide la acumulación nuclear del complejo ciclina B1/Cdc2. En la prometafase, el SAC impide la separación de las cromátidas hasta que los cromosomas se encuentren correctamente unidos y alineados en el huso mitótico [266]. La pérdida de expresión conjunta de los genes que participan de ambos sistemas de control explicaría la mayor sensibilidad a los inhibidores de los microtúbulos en los pacientes mayores.

Al momento de evaluar respuesta no fue posible establecer una asociación significativa entre el estado de metilación de *CHFR* y la respuesta al tratamiento con docetaxel, como había sido planteado en numerosas investigaciones desarrolladas en líneas celulares de distintos tumores [244, 256-258, 271]. Sin embargo, al analizar sólo aquellos pacientes respondedores, es decir, aquellos con respuesta completa y parcial, se observa una ventaja significativa en la supervivencia de aquellos que presentan hipermetilación de *CHFR* (Figura 19).

Discusión

Por otra parte, también se analizó que influencia podía tener la primera línea de tratamiento en la supervivencia global de aquellos pacientes que recibieron segundas líneas de tratamiento, examinado también si el estado de metilación de *CHFR* en suero de estos pacientes puede ser empleado como un posible marcador asociado a mejor supervivencia en una segunda línea de tratamiento.

Hasta el momento es escasa la información de acerca de la influencia de primeras líneas de tratamiento y marcadores moleculares en la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado que reciben segundas líneas de tratamiento.

Por lo general, la supervivencia en los estudios aleatorizados de segundas líneas de tratamiento, en pacientes tratados con quimioterapia o inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKIs), es calculada desde el inicio de la segunda línea de tratamiento [52, 272, 273]. En un estudio japonés, la administración de EGFR TKIs como segunda línea de tratamiento se asocia a una mejor supervivencia global [274].

En el presente estudio, aquellos pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado tratados en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKIs) presentaron un supervivencia media de 19 meses desde el inicio del tratamiento con quimioterapia (Figura 22). Además en el análisis multivariable de este grupo de 179 pacientes tratados en segunda línea, el empleo de EGFR TKIs como segunda línea de tratamiento y el tiempo transcurrido entre la primera y segunda línea de tratamiento aparecen como marcadores pronóstico asociados a una mejor supervivencia (Tabla 17).

En general, la mayor parte de los pacientes que recibieron EGFR TKIs son mujeres con histología de adenocarcinoma. Sin embargo en un estudio multicéntrico presentado en el Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón en 2007, en el que se aleatorizaron más de 1400 pacientes a recibir docetaxel o gefinitib como segunda línea de tratamiento no se observó una asociación significativa entre la supervivencia y el sexo, la histología o el tipo de quimioterapia recibida en primera línea [275].

Discusión

Dos hallazgos fundamentales se desprenden del estudio del tratamiento en segunda línea en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.

Por un lado, aquellos pacientes que recibieron cisplatino/docetaxel en primera línea seguido de EGFR TKIs en segunda línea alcanzaron una supervivencia de 19,2 meses, significativamente más prolongada que los 10,6 meses de los pacientes tratados en segunda línea con quimioterapia, $p=0.0002$. Sin embargo, en aquellos pacientes tratados en primera línea con gemcitabina/docetaxel no se halló diferencia significativa en la supervivencia según el tipo de tratamiento en segunda línea recibido (Tabla 15).

En los ensayos llevados a cabo en líneas celulares de cáncer de pulmón, el tratamiento secuencial de cisplatino seguido de erlotinib (EGFR TKIs) presentó un efecto sinérgico en seis de las siete líneas celulares analizadas. Sólo la línea celular H209 se observó un efecto antagónico tras el tratamiento secuencial de cisplatino/erlotinib (Tabla 19).

Se han propuesto diversos mecanismo a través de los cuales los inhibidores de EGFR interaccionan con la quimioterapia. Uno de ellos es a través de la regulación de las respuestas intracelulares generadas tras la activación de EGFR.

En líneas celulares, el tratamiento con cisplatino demostró activar la vía de transducción de señales en las que intervienen JNK y MAPK, promoviendo la muerte celular programada [276]. La exposición al cisplatino también induce la autofosforilación de EGFR mediante la activación de la vía de señalización de la familia de la Src quinasa. Estas proteínas están involucradas en la respuesta al stress celular generado tras la exposición a la luz ultravioleta, el shock térmico o el stress oxidativo. Además intervienen como mediadoras entre varias vías de señalización intracelulares. La activación de EGFR favorece la activación de múltiples vías de señalización intracelulares cruciales para la supervivencia, proliferación y transformación celular. El empleo de EGFR TKIs incrementa el efecto terapéutico del cisplatino, al bloquear la activación de EGFR y favorecer los efectos apoptóticos desencadenados tras el tratamiento con cisplatino [277].

Además, es bien conocido que el tratamiento con agentes platinados genera diversos tipos de daños en el ADN y que en respuesta a ellos se activan mecanismos

que regulan la reparación, el ciclo y la supervivencia celular. Tras el tratamiento con cisplatino, se favorece la traslocación de EGFR al núcleo y el consiguiente incremento en la actividad de la DNAPK (Proteína quinasa dependiente de ADN), involucrada en los mecanismos de reparación del ADN, recombinación y transcripción. Recientemente se observó que los inhibidores de EGFR impiden la reparación de estos daños en el ADN al modular la asociación entre EGFR y la DNAPK [278].

El tratamiento con gemcitabina también favorece la fosforilación de EGFR. Sin embargo, en este caso dicha activación conlleva a la activación la vía de Akt y simultáneamente promueve la ubiquitinización del receptor. La degradación del receptor a través del proteasoma inhibe las señales de supervivencia iniciadas tras la activación de la vía de Akt, conduciendo a las células a la apoptosis. Al bloquear la degradación del EGFR mediante el empleo de EGFR TKIs o inhibidores del proteasoma se elimina el efecto citotóxico generado tras el tratamiento con gemcitabina (Figura 28) [279].

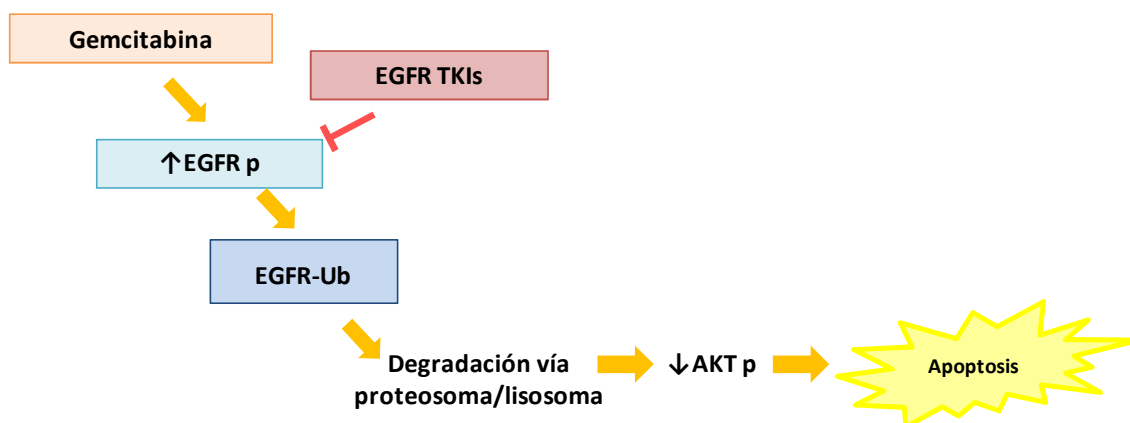


Figura 28: Modelo de la inducción de la apoptosis por la gemcitabina a través de la degradación de EGFR. La gemcitabina induce la fosforilación de EGFR lo que promueve su ubiquitinización y degradación en el proteasoma y lisosoma, provocando la desregulación de las señales de supervivencia de la vía de la AKT y desencadenando la apoptosis. El bloqueo de la degradación de EGFR mediante el empleo de gefitinib reduce la muerte celular inducida por el tratamiento con gemcitabina. (Modificado de [279])

El otro dato interesante que surge del estudio de este grupo de pacientes es la asociación entre el estado de metilación de *CHFR* y la supervivencia. La supervivencia media de los pacientes con *CHFR* no metilado tratados en segunda línea con EGFR TKIs fue de 21,3 meses, sorprendentemente más prolongada que los 11,2 meses de aquellos pacientes que recibieron quimioterapia ($p=0.0001$). Para el grupo de pacientes con *CHFR* metilado no se observó diferencia en la supervivencia de acuerdo al tipo de segunda línea recibida (Tabla 15).

Discusión

Como se comentó anteriormente, en los ensayos llevados a cabo con líneas celulares de cáncer de pulmón, sólo H209 presentó un comportamiento antagónico al tratamiento secuencial de cisplatino/erlotinib. Sumado a este hecho, por western blotting, H209 es la única línea celular que expresa muy bajos niveles de *CHFR*, aunque no presenta ninguno de sus islotes CpG metilados.

En los pacientes con *CHFR* metilado no existe diferencia en la supervivencia al ser tratados de manera secuencial con cisplatino/erlotinib o cisplatino/quimioterapia, aunque dicha diferencia sí es evidente en los pacientes con *CHFR* no metilado. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos del estudio en líneas celulares. El tratamiento secuencial con cisplatino/erlotinib resultó sinérgico en aquellas líneas que expresan *CHFR* y antagónico en H209 (Figura 25 y Tabla 19).

CHFR presenta un dominio RF que resulta indispensable para su actividad de ubiquitina ligasa [244]. Mediante la actividad ubiquitina ligasa se favorece la degradación de gran número de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular entre las que se encuentran Aurora A y Plk-1 [245, 247]. El prototipo de ubiquitina ligasa es el protooncogén c-Cbl que se encarga de la ubiquitinización y posterior degradación en el proteosoma de receptores tirosina quinasa [243]. Sin embargo, tumores de cáncer de pulmón no microcítico muestran una alteración en los mecanismo de degradación de los receptores mediado por c-Cbl [280]. La alineación de las secuencias del dominio RF de *CHFR* y otros genes con actividad ubiquitina ligasa, entre los que se encuentra el c-Cbl, presentan elevada homología [245], por lo que *CHFR* podría ser el responsable de intervenir en la degradación de EGFR en el proteosoma.

Estos hallazgos confirman el impacto del tratamiento con EGFR TKIs en segunda línea de tratamiento en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.

En resumen, en este trabajo se estudió por primera vez el estado de metilación de *CHFR* en suero de pacientes con cáncer de pulmón avanzado en los que no es accesible una pieza tumoral para su estudio. Sólo se observa una ventaja de tratamiento en aquellos pacientes con *CHFR* metilado mayores de 66 años al ser tratados con inhibidores de agentes antimicrotúbulos, a pesar de no existir un mecanismo

Discusión

completamente claro que explique esta diferencia en la supervivencia.

Sin embargo, el hallazgo más trascendente se traduce del impacto en la supervivencia del tratamiento en segunda línea de estos pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado, en los que se observa un beneficio en aquellos pacientes tratados con EGFR TKIs. El tratamiento inicial con cisplatino es importante en el tratamiento de estos pacientes, pero la administración de quimioterapia como segunda línea de tratamiento no mejora la supervivencia.

Es por todo ello que resulta primordial el estudio de las implicancias de segundas líneas de tratamiento y de marcadores moleculares como *CHFR* en estudios aleatorizados fase III con la finalidad de ampliar los conocimientos sobre la influencia de segundas líneas de tratamiento en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.

6. CONCLUSIONES

Objetivo 1: “Estudiar el estado de metilación de *CHFR* en ADN tumoral circulante de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado”.

- Es posible analizar el estado de metilación de *CHFR* en suero de pacientes tratados con quimioterapia.
- *CHFR* se encuentra metilado en suero de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado con una frecuencia de 32,4%.
- No se ha podido establecer una correlación significativa en el estado de metilación de *CHFR* en suero y las características clínicas de los pacientes estudiados.
- Ni la supervivencia ni el tiempo a la progresión se correlacionan significativamente con el estado de metilación de *CHFR* en este grupo de pacientes.
- No fue posible establecer una asociación estadística entre el estado de metilación de *CHFR* y la respuesta al tratamiento con antimicrotúbulos. Sin embargo, la supervivencia es mayor para los respondedores con *CHFR* metilado.
- Los pacientes mayores de 66 años que presentan hipermetilación de *CHFR* muestran mayor supervivencia y tiempo a la progresión al ser tratados con agentes antimicrotúbulos.

Objetivo 2: “Estudiar la influencia de segundas líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.”

- No existe diferencia significativa entre los pacientes de este estudio que recibieron o no segunda línea de tratamiento y las características clínicas y moleculares evaluadas.
- La administración de una segunda línea de tratamiento prologa la supervivencia global de los pacientes estudiados.
- El tratamiento en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico confiere mayor supervivencia que el tratamiento con quimioterapia en estos pacientes con cáncer de pulmón avanzado.
- El tratamiento secuencial en primera línea con cisplatino y en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico se asocia a mayor supervivencia en este grupo de pacientes.

Conclusiones

- La expresión de *CHFR* confiere mayor supervivencia en los pacientes tratados en segunda línea con inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico.
- Sólo el empleo de inhibidores del dominio tirosina quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico y el mayor tiempo transcurrido entre la primera y segunda línea de tratamiento emergen como factores pronóstico.

Objetivo 3: “Examinar en un modelo de líneas celulares de cáncer de pulmón el efecto del tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib.”

- *CHFR* se encuentra no metilado en todas de las líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas.
- Todas las líneas celulares estudiadas expresan niveles significativos de *CHFR*, a excepción de H209.
- La falta de expresión de *CHFR* en H209 no está asociada a su estado de metilación.
- La expresión de EGFR es variable en las líneas celulares de cáncer de pulmón analizadas.
- Todas las líneas celulares mostraron un efecto sinérgico tras el tratamiento secuencial con cisplatino y erlotinib, a excepción de H209 que no expresa *CHFR*.
- Por la alta homología con c-Cbl, *CHFR* podría contribuir en la degradación de EGFR en el proteasoma.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Ferlay J, B.F., Pisani P, Parkin DM *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence 2004*, Lyon: IARC Press 2004
2. Bray, F., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002. **38**(1): p. 99-166.
3. Lopez Abente, G.y.c., *La situación del cáncer en España* Ministerio de Sanidad y Consumo - Madrid, 2005.
4. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 481-8.
5. Bosetti, C., et al., *Lung cancer mortality in European women: recent trends and perspectives*. Ann Oncol, 2005. **16**(10): p. 1597-604.
6. Hecht, S.S., *Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms*. Langenbecks Arch Surg, 2006. **391**(6): p. 603-13.
7. Hirao, T., et al., *Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 612-5.
8. Hecht, S.S., *A biomarker of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and Ernst Wynder's opinion about ETS and lung cancer*. Prev Med, 2006. **43**(4): p. 256-60.
9. Schwartz, A.G., *Lung cancer: family history matters*. Chest, 2006. **130**(4): p. 936-7.
10. Kiyohara, C., et al., *Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review*. Lung Cancer, 2002. **37**(3): p. 241-56.
11. Ringer, G., et al., *Influence of sex on lung cancer histology, stage, and survival in a midwestern United States tumor registry*. Clin Lung Cancer, 2005. **7**(3): p. 180-2.
12. Marquez-Garban, D.C., et al., *Estrogen receptor signaling pathways in human non-small cell lung cancer*. Steroids, 2007. **72**(2): p. 135-43.
13. Boffetta, P., *Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence*. Mutat Res, 2006. **608**(2): p. 157-62.
14. Key, T.J., et al., *The effect of diet on risk of cancer*. Lancet, 2002. **360**(9336): p. 861-8.
15. Wei, Q., et al., *Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(10): p. 963-9.
16. Key, T.J., et al., *Diet, nutrition and the prevention of cancer*. Public Health Nutr, 2004. **7**(1A): p. 187-200.
17. De Vita VT, H.S., Rossenberg SA, *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 7th Ed ed, ed. L.W. Wilkins. 2004, Baltimore, MD 21201.
18. RHTE, *Registros Hospitalarios de Tumores Españoles 2005*.
19. Beckles, M.A., et al., *Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes*. Chest, 2003. **123**(1 Suppl): p. 97S-104S.
20. Rivera, M.P., F. Detterbeck, and A.C. Mehta, *Diagnosis of lung cancer: the guidelines*. Chest, 2003. **123**(1 Suppl): p. 129S-136S.
21. Kubota, K., et al., *Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography: a prospective study*. J Nucl Med, 1990. **31**(12): p. 1927-32.
22. Pieterman, R.M., et al., *Preoperative staging of non-small-cell lung cancer with positron-emission tomography*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 254-61.
23. IUCC, *TMN Staging History*.
24. Mountain, C.F., *Revisions in the International System for Staging Lung Cancer*. Chest, 1997. **111**(6): p. 1710-7.

Bibliografia

25. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(8): p. 706-14.
26. National Comprehensive Cancer Network. *Non-small cell lung cancer. Version 2.2006*. 2006 [cited].
27. Swanson, S.J. and H.F. Batirel, *Video-assisted thoracic surgery (VATS) resection for lung cancer*. Surg Clin North Am, 2002. **82**(3): p. 541-59.
28. Roviato, G., et al., *Long-term survival after videothoroscopic lobectomy for stage I lung cancer*. Chest, 2004. **126**(3): p. 725-32.
29. Onishi, H., et al., *Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma: clinical outcomes in 245 subjects in a Japanese multiinstitutional study*. Cancer, 2004. **101**(7): p. 1623-31.
30. Bonomi, P., et al., *Comparison of survival and quality of life in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposide with cisplatin: results of an Eastern Cooperative Oncology Group trial*. J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 623-31.
31. Schiller, J.H., et al., *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2002. **346**(2): p. 92-8.
32. Kelly, K., et al., *Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial*. J Clin Oncol, 2001. **19**(13): p. 3210-8.
33. Le Chevalier, T., et al., *Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients*. J Clin Oncol, 1994. **12**(2): p. 360-7.
34. Scagliotti, G.V., et al., *Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4285-91.
35. Arriagada, R., et al., *Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(4): p. 351-60.
36. Douillard, J.Y., et al., *Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-III A non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(9): p. 719-27.
37. Furuse, K., et al., *Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(9): p. 2692-9.
38. Souquet, P.J., et al., *Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis*. Lancet, 1993. **342**(8862): p. 19-21.
39. Winton, T., et al., *Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(25): p. 2589-97.
40. Strauss, H., Maddaus, et al *Randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and carboplatin following resection in stage IB non-small cell lung cancer (NSCLC): Report of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) Procolo 9633 J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2004. 7019.*
41. Strauss, H., Maddaus, et al for the CALGB, Radiation Therapy Oncology Group *Adjuvant chemotherapy in stage IB non-small cell lung cancer (NSCLC): Update of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) protocol 9633. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2006. 24:7007.*
42. Rosell, R., et al., *A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus*

- surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 1994. **330**(3): p. 153-8.
43. Mattson, K.V., et al., *Docetaxel as neoadjuvant therapy for radically treatable stage III non-small-cell lung cancer: a multinational randomised phase III study*. *Ann Oncol*, 2003. **14**(1): p. 116-22.
44. Betticher, D.C., et al., *Mediastinal lymph node clearance after docetaxel-cisplatin neoadjuvant chemotherapy is prognostic of survival in patients with stage IIIA pN2 non-small-cell lung cancer: a multicenter phase II trial*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(9): p. 1752-9.
45. Van Zandwijk, N., et al., *Gemcitabine and cisplatin as induction regimen for patients with biopsy-proven stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer: a phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group (EORTC 08955)*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(14): p. 2658-64.
46. Garrido, P., et al., *Long-term survival associated with complete resection after induction chemotherapy in stage IIIA (N2) and IIIB (T4N0-1) non small-cell lung cancer patients: the Spanish Lung Cancer Group Trial 9901*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(30): p. 4736-42.
47. Le Chevalier, T., et al., *Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: first analysis of a randomized trial in 353 patients*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(6): p. 417-23.
48. Gandara, D.R., et al., *Consolidation docetaxel after concurrent chemoradiotherapy in stage IIIB non-small-cell lung cancer: phase II Southwest Oncology Group Study S9504*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(10): p. 2004-10.
49. Gandara, D.R., et al., *Long-term survival with concurrent chemoradiation therapy followed by consolidation docetaxel in stage IIIB non-small-cell lung cancer: a phase II Southwest Oncology Group Study (S9504)*. *Clin Lung Cancer*, 2006. **8**(2): p. 116-21.
50. Huber, R.M., et al., *Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(27): p. 4397-404.
51. Giaccone, G., *Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(14): p. 3235-42.
52. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(2): p. 123-32.
53. Rosell, R., et al., *Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7222-31.
54. Rosell, R., E. Felip, and L. Paz-Ares, *How could pharmacogenomics help improve patient survival?* *Lung Cancer*, 2007. **57 Suppl 2**: p. S35-41.
55. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. *PLoS Med*, 2005. **2**(3): p. e73.
56. Sandler, A.B., D.H. Johnson, and R.S. Herbst, *Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(12 Pt 2): p. 4258s-4262s.
57. Yaguchi, S., et al., *Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(8): p. 545-56.
58. Selvaggi, G., et al., *Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer*. *Ann Oncol*,

2004. **15**(1): p. 28-32.
59. Tateishi, M., et al., *Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung*. *Cancer Res*, 1990. **50**(21): p. 7077-80.
60. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
61. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. *Science*, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
62. Taron, M., et al., *Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(16): p. 5878-85.
63. Martin, B., et al., *Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(1): p. 55-64.
64. Mitsudomi, T., et al., *[Mutations of ras and p53 genes in human non-small cell lung cancer cell lines and their clinical significance]*. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1992. **93**(9): p. 944-7.
65. Rosell, R., et al., *Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients*. *Oncogene*, 1993. **8**(9): p. 2407-12.
66. Schiller, J.H., et al., *Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a Laboratory Ancillary Study on an Eastern Cooperative Oncology Group Prospective Randomized Trial of Postoperative Adjuvant Therapy*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(2): p. 448-57.
67. Neri, M., et al., *Prognostic role of K-Ras mutations in non-small cell lung cancer: still an issue for open debate*. *Lung Cancer*, 2006. **53**(3): p. 393-5; author reply 397-8.
68. Zajac-Kaye, M., *Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer*. *Lung Cancer*, 2001. **34 Suppl 2**: p. S43-6.
69. Johnson, B.E., et al., *myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(6): p. 1629-34.
70. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. *Science*, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
71. Gao, H.G., et al., *Distribution of p53 and K-ras mutations in human lung cancer tissues*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(3): p. 473-8.
72. Toyooka, S., T. Tsuda, and A.F. Gazdar, *The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer*. *Hum Mutat*, 2003. **21**(3): p. 229-39.
73. Mitsudomi, T., et al., *Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(10): p. 4055-63.
74. Reissmann, P.T., et al., *Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer*. *The Lung Cancer Study Group*. *Oncogene*, 1993. **8**(7): p. 1913-9.
75. Meuwissen, R. and A. Berns, *Mouse models for human lung cancer*. *Genes Dev*, 2005. **19**(6): p. 643-64.
76. Ratschiller, D., et al., *Cyclin D1 overexpression in bronchial epithelia of patients with lung cancer is associated with smoking and predicts survival*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(11): p. 2085-93.
77. Dobashi, Y., et al., *Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma*. *Int J*

Bibliografia

- Cancer, 2004. **110**(4): p. 532-41.
78. Akin, H., et al., *Clinical significance of P16INK4A and retinoblastoma proteins in non-small-cell lung carcinoma*. Lung Cancer, 2002. **38**(3): p. 253-60.
79. Awaya, H., et al., *Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung*. Pathol Int, 2004. **54**(7): p. 486-9.
80. Jarmalaite, S., et al., *Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer, 2003. **106**(6): p. 913-8.
81. Vonlanthen, S., et al., *The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression*. Br J Cancer, 2001. **84**(10): p. 1372-6.
82. Balsara, B.R. and J.R. Testa, *Chromosomal imbalances in human lung cancer*. Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6877-83.
83. Sozzi, G., et al., *The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer*. Cell, 1996. **85**(1): p. 17-26.
84. Wistuba, II, et al., *High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1949-60.
85. Vavvas, D., et al., *Identification of Nore1 as a potential Ras effector*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5439-42.
86. Pfeifer, G.P. and R. Dammann, *Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(5): p. 576-83.
87. Honorio, S., et al., *Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients*. Oncogene, 2003. **22**(1): p. 147-50.
88. Dammann, R., T. Takahashi, and G.P. Pfeifer, *The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas*. Oncogene, 2001. **20**(27): p. 3563-7.
89. Topaloglu, O., et al., *Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2284-8.
90. Ramirez, J.L., et al., *Serum DNA as a tool for cancer patient management*. Roczniki Akad Med Białymost, 2003. **48**: p. 34-41.
91. Zochbauer-Muller, S., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 249-55.
92. Xu, X.C., et al., *Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(9): p. 624-9.
93. Soria, J.C., et al., *Retinoic acid receptor beta and telomerase catalytic subunit expression in bronchial epithelium of heavy smokers*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(2): p. 165-8.
94. Nakamura, F., R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter, *Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance*. J Neurobiol, 2000. **44**(2): p. 219-29.
95. Futamura, M., et al., *Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1451-60.
96. Kusy, S., et al., *Promoter characterization of Semaphorin SEMA3F, a tumor suppressor gene*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1730**(1): p. 66-76.
97. Soria, J.C., et al., *Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1178-84.

Bibliografia

98. Kim, N.W., et al., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
99. Soria, J.C., et al., *Effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(16): p. 1257-63.
100. Wang, L., et al., *hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(9): p. 2883-9.
101. Zhu, C.Q., et al., *Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(10): p. 1452-9.
102. Koomagi, R. and M. Volm, *Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance*. Int J Cancer, 1999. **84**(3): p. 239-43.
103. Brambilla, C., et al., *Early detection of lung cancer: role of biomarkers*. Eur Respir J Suppl, 2003. **39**: p. 36s-44s.
104. Falleni, M., et al., *Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer*. J Pathol, 2003. **200**(5): p. 620-6.
105. Kren, L., et al., *Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004. **12**(1): p. 44-9.
106. Lantuejoul, S., et al., *Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines*. J Pathol, 2003. **200**(3): p. 336-47.
107. Delmotte, P., et al., *[VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis]*. Rev Mal Respir, 2002. **19**(5 Pt 1): p. 577-84.
108. Nakashima, T., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C as prognostic factors for non-small cell lung cancer*. Med Sci Monit, 2004. **10**(6): p. BR157-65.
109. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(1): p. F79-113.
110. Koukourakis, M.I., et al., *Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer, 1997. **75**(4): p. 477-81.
111. Takanami, I., et al., *Immunohistochemical detection of basic fibroblast growth factor as a prognostic indicator in pulmonary adenocarcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 1996. **26**(5): p. 293-7.
112. Volm, M., et al., *Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas*. Eur J Cancer, 1997. **33**(4): p. 691-3.
113. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.
114. Masuya, D., et al., *The intratumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 associated with angiogenesis in nonsmall cell lung carcinoma patients*. Cancer, 2001. **92**(10): p. 2628-38.
115. Eisma, R.J., J.D. Spiro, and D.L. Kreutzer, *Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma*. Laryngoscope, 1999. **109**(5): p. 687-93.
116. Ueda, T., E. Shimada, and T. Urakawa, *Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis*. J Gastroenterol, 1994. **29**(4): p. 423-9.

Bibliografia

117. Desbaillets, I., et al., *Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1201-12.
118. Luca, M., et al., *Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1105-13.
119. Yuan, A., et al., *Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(5): p. 1957-63.
120. Boldrini, L., et al., *Interleukin-8 in non-small cell lung carcinoma: relation with angiogenic pattern and p53 alterations*. Lung Cancer, 2005. **50**(3): p. 309-17.
121. Volm, M., J. Mattern, and R. Koomagi, *Angiostatin expression in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3236-40.
122. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell, 1997. **88**(2): p. 277-85.
123. Chang, H., et al., *Increased expression of collagen XVIII and its prognostic value in nonsmall cell lung carcinoma*. Cancer, 2004. **100**(8): p. 1665-72.
124. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
125. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
126. Frisch, S.M. and R.A. Screaton, *Anoikis mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 555-62.
127. Wicki, A., et al., *Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 261-72.
128. Christofori, G., *Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression*. Embo J, 2003. **22**(10): p. 2318-23.
129. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(1): p. 11-26.
130. Pirinen, R.T., et al., *Reduced expression of alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer*. J Clin Pathol, 2001. **54**(5): p. 391-5.
131. Nawrocki-Raby, B., et al., *Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells*. Int J Cancer, 2003. **105**(6): p. 790-5.
132. Tomita, K., et al., *Cadherin switching in human prostate cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3650-4.
133. Christofori, G., *New signals from the invasive front*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 444-50.
134. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-32.
135. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, *Role of integrins in cell invasion and migration*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 91-100.
136. Gogali, A., K. Charalabopoulos, and S. Constantopoulos, *Integrin receptors in primary lung cancer*. Exp Oncol, 2004. **26**(2): p. 106-10.
137. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.

Bibliografia

138. Fulton, A.M., S.E. Loveless, and G.H. Heppner, *Mutagenic activity of tumor-associated macrophages in Salmonella typhimurium strains TA98 and TA 100*. *Cancer Res*, 1984. **44**(10): p. 4308-11.
139. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. *J Pathol*, 2002. **196**(3): p. 254-65.
140. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
141. Leek, R.D. and A.L. Harris, *Tumor-associated macrophages in breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 177-89.
142. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 263-6.
143. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 453-8.
144. Kang, Y., et al., *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(6): p. 537-49.
145. Minn, A.J., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. *Nature*, 2005. **436**(7050): p. 518-24.
146. Anker, P., et al., *Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients*. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. **18**(1): p. 65-73.
147. Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. *Cancer Res*, 1977. **37**(3): p. 646-50.
148. Stroun, M., et al., *Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients*. *Oncology*, 1989. **46**(5): p. 318-22.
149. Sorenson, G.D., et al., *Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. **3**(1): p. 67-71.
150. Beljanski, M., P. Bourgarel, and M. Beljanski, *Correlation between in vitro DNA synthesis, DNA strand separation and in vivo multiplication of cancer cells*. *Exp Cell Biol*, 1981. **49**(4): p. 220-31.
151. Sorenson, *Communication at the XXXVth Anniversary Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine; Montreux, Switzerland, September 1997*. 1997

152. Choi, J.J., C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro*. *Scand J Immunol*, 2004. **60**(1-2): p. 159-66.
153. Jahr, S., et al., *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
154. Diehl, F., et al., *Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(45): p. 16368-73.
155. Anker, P., M. Stroun, and P.A. Maurice, *Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system*. *Cancer Res*, 1975. **35**(9): p. 2375-82.
156. Hess, E.L., J.W. Hahn, and W. Ayala, *Structures responsible for the characteristic purple color development in diphenylamine reaction with serum*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956. **91**(4): p. 528-31.
157. Kamm, R.C. and A.G. Smith, *Nucleic acid concentrations in normal human plasma*. *Clin Chem*, 1972. **18**(6): p. 519-22.
158. Lee, J.B., *Compounds Interfering in the Diphenylamine Test for Deoxyribonucleic Acid*. *Nature*, 1963. **200**: p. 264-6.

Bibliografia

159. Steinman, C.R., *Use of nucleic acid hybridization for specific detection of submicrogram quantities of DNA, and its application to human plasma*. Clin Chem, 1975. **21**(3): p. 407-11.
160. Davis, G.L., Jr. and J.S.t. Davis, *Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE)*. Arthritis Rheum, 1973. **16**(1): p. 52-8.
161. Leon, S.A., et al., *Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA*. J Immunol Methods, 1975. **9**(2): p. 157-64.
162. Beau-Faller, M., et al., *Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients*. Int J Cancer, 2003. **105**(3): p. 361-70.
163. Xie, G.S., et al., *Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(10): p. 1485-8.
164. Herrera, L.J., et al., *Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies*. Clin Chem, 2005. **51**(1): p. 113-8.
165. Fournie, G.J., et al., *Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours*. Cancer Lett, 1995. **91**(2): p. 221-7.
166. Sozzi, G., et al., *Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4675-8.
167. Sozzi, G., et al., *Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3902-8.
168. Laktionov, P.P., et al., *Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2004. **23**(6-7): p. 879-83.
169. Gautschi, O., et al., *Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy*. J Clin Oncol, 2004. **22**(20): p. 4157-64.
170. Ramirez, J.L., et al., *Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients*. Cancer Lett, 2003. **193**(2): p. 207-16.
171. Bearzatto, A., et al., *p16(INK4A) Hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3782-7.
172. Trombino, S., et al., *Mutations in K-ras codon 12 detected in plasma DNA are not an indicator of disease in patients with non-small cell lung cancer*. Clin Chem, 2005. **51**(7): p. 1313-4.
173. Camps, C., et al., *Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer?* Lung Cancer, 2005. **50**(3): p. 339-46.
174. Kimura, T., et al., *Mutant DNA in plasma of lung cancer patients: potential for monitoring response to therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1022**: p. 55-60.
175. Silva, J.M., et al., *TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients*. Genes Chromosomes Cancer, 1999. **24**(2): p. 160-1.
176. Andriani, F., et al., *Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers*. Int J Cancer, 2004. **108**(1): p. 91-6.
177. Gonzalez, R., et al., *Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance*. Ann Oncol, 2000. **11**(9): p. 1097-104.
178. Chen, X.Q., et al., *Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1033-5.
179. Nawroz, H., et al., *Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck*

Bibliografia

- cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1035-7.
180. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients*. Ann Oncol, 1998. **9**(1): p. 113-6.
181. Sozzi, G., et al., *Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2689-92.
182. Allan, J.M., et al., *Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer*. Int J Cancer, 2001. **91**(3): p. 359-65.
183. Baylin, S.B., S.A. Belinsky, and J.G. Herman, *Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1460-1.
184. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
185. Esteller, M., et al., *Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 67-70.
186. Fujiwara, K., et al., *Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1219-25.
187. Belinsky, S.A., et al., *Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6505-11.
188. Usadel, H., et al., *Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 371-5.
189. Ramirez, J.L., et al., *14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(36): p. 9105-12.
190. Osada, H. and T. Takahashi, *Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7421-34.
191. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
192. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
193. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
194. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
195. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
196. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
197. Khorasanizadeh, S., *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation*. Cell, 2004. **116**(2): p. 259-72.
198. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
199. Kurdستاني, S.K. and M. Grunstein, *Histone acetylation and deacetylation in yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(4): p. 276-84.

Bibliografia

200. Prokhortchouk, E. and B. Hendrich, *Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs?* *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5394-9.
201. Hendrich, B. and A. Bird, *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(11): p. 6538-47.
202. Prokhortchouk, A., et al., *The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor*. *Genes Dev*, 2001. **15**(13): p. 1613-8.
203. Das, P.M. and R. Singal, *DNA methylation and cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(22): p. 4632-42.
204. Goelz, S.E., et al., *Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms*. *Science*, 1985. **228**(4696): p. 187-90.
205. Pufulete, M., et al., *Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1240-8.
206. Szyf, M., P. Pakneshan, and S.A. Rabbani, *DNA methylation and breast cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(6): p. 1187-97.
207. Carnell, A.N. and J.I. Goodman, *The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity*. *Toxicol Sci*, 2003. **75**(2): p. 229-35.
208. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. *Nat Genet*, 1999. **21**(2): p. 163-7.
209. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 157-62.
210. Esteller, M., et al., *DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(26): p. 3001-7.
211. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 415-28.
212. Melki, J.R., et al., *Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia*. *Leukemia*, 1998. **12**(3): p. 311-6.
213. Clark, S.J. and J. Melki, *DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?* *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5380-7.
214. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(4): p. 286-98.
215. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
216. Lujambio, A., et al., *Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1424-9.
217. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
218. Yan, P.S., et al., *Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation*. *J Nutr*, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2430S-2434S.
219. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
220. Shapiro, R. and J.M. Weisgras, *Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970. **40**(4): p. 839-43.
221. Xiong, Z. and P.W. Laird, *COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(12): p. 2532-4.
222. Gonzalgo, M.L. and P.A. Jones, *Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (MS-SNuPE)*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(12): p. 2529-31.
223. Nuovo, G.J., et al., *In situ detection of the hypermethylation-induced*

- inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12754-9.
224. Baumer, A., et al., *A novel MSP/DHPLC method for the investigation of the methylation status of imprinted genes enables the molecular detection of low cell mosaicisms.* Hum Mutat, 2001. **17**(5): p. 423-30.
225. Eads, C.A., et al., *MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(8): p. E32.
226. Sidransky, D., *Emerging molecular markers of cancer.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 210-9.
227. Adorjan, P., et al., *Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(5): p. e21.
228. Graziano, F., et al., *Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2784-9.
229. Toyooka, S., et al., *The relationship between aberrant methylation and survival in non-small-cell lung cancers.* Br J Cancer, 2004. **91**(4): p. 771-4.
230. Mehrotra, J., et al., *Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3104-9.
231. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
232. Esteller, M., et al., *Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma.* J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(1): p. 26-32.
233. Cihak, A., *Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes.* Oncology, 1974. **30**(5): p. 405-22.
234. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.* Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
235. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B.* J Clin Oncol, 2002. **20**(10): p. 2429-40.
236. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.* Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 103-7.
237. Perez de Castro, I., G. de Carcer, and M. Malumbres, *A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy.* Carcinogenesis, 2007. **28**(5): p. 899-912.
238. Scolnick, D.M. and T.D. Halazonetis, *Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase.* Nature, 2000. **406**(6794): p. 430-5.
239. Jha, M.N., J.R. Bamburg, and J.S. Bedford, *Cell cycle arrest by Colcemid differs in human normal and tumor cells.* Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 5011-5.
240. Sun, Z., et al., *Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint.* Science, 1998. **281**(5374): p. 272-4.
241. Stavridi, E.S., et al., *Crystal structure of the FHA domain of the Chfr mitotic checkpoint protein and its complex with tungstate.* Structure, 2002. **10**(7): p. 891-9.
242. Passmore, L.A. and D. Barford, *Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation.* Biochem J, 2004. **379**(Pt 3): p. 513-25.
243. Joazeiro, C.A., et al., *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase.* Science, 1999. **286**(5438): p. 309-12.
244. Chaturvedi, P., et al., *Chfr regulates a mitotic stress pathway through its RING-finger domain with ubiquitin ligase activity.* Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1797-801.

Bibliografia

245. Kang, D., et al., *The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 249-59.
246. Summers, M.K., J. Bothos, and T.D. Halazonetis, *The CHFR mitotic checkpoint protein delays cell cycle progression by excluding Cyclin B1 from the nucleus*. Oncogene, 2005. **24**(16): p. 2589-98.
247. Yu, X., et al., *Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 401-6.
248. Matsusaka, T. and J. Pines, *Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells*. J Cell Biol, 2004. **166**(4): p. 507-16.
249. Bothos, J., et al., *The Chfr mitotic checkpoint protein functions with Ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains*. Oncogene, 2003. **22**(46): p. 7101-7.
250. Oh, Y.M., S.J. Yoo, and J.H. Seol, *Deubiquitination of Chfr, a checkpoint protein, by USP7/HAUSP regulates its stability and activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(3): p. 615-9.
251. Daniels, M.J., A. Marson, and A.R. Venkitaraman, *PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1114-21.
252. Burgess, A., et al., *Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle*. Oncogene, 2008.
253. Mizuno, K., et al., *Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers*. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2328-33.
254. Mariatos, G., et al., *Inactivating mutations targeting the chfr mitotic checkpoint gene in human lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7185-9.
255. Corn, P.G., et al., *Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of the mitotic stress checkpoint gene Chfr in colorectal and non-small cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2003. **24**(1): p. 47-51.
256. Toyota, M., et al., *Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7818-23.
257. Privette, L.M., et al., *Altered expression of the early mitotic checkpoint protein, CHFR, in breast cancers: implications for tumor suppression*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6064-74.
258. Koga, Y., et al., *The significance of aberrant CHFR methylation for clinical response to microtubule inhibitors in gastric cancer*. J Gastroenterol, 2006. **41**(2): p. 133-9.
259. Cheung, H.W., et al., *Epigenetic inactivation of CHFR in nasopharyngeal carcinoma through promoter methylation*. Mol Carcinog, 2005. **43**(4): p. 237-45.
260. Honda, T., et al., *Promoter hypermethylation of the Chfr gene in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia*. Br J Cancer, 2004. **90**(10): p. 2013-6.
261. Yanokura, M., et al., *Relationship of aberrant DNA hypermethylation of CHFR with sensitivity to taxanes in endometrial cancer*. Oncol Rep, 2007. **17**(1): p. 41-8.
262. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 106-30.
263. Markowitz, S.B., et al., *Ability of low-dose helical CT to distinguish between benign and malignant noncalcified lung nodules*. Chest, 2007. **131**(4): p. 1028-34.
264. Wistuba, II and A.F. Gazdar, *Lung cancer preneoplasia*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 331-48.
265. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
266. Baker, D.J., J. Chen, and J.M. van Deursen, *The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us?* Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 583-9.

Bibliografía

267. Ogi, K., et al., *Small interfering RNA-induced CHFR silencing sensitizes oral squamous cell cancer cells to microtubule inhibitors*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(7): p. 773-80.
268. Cobo Manuel, I.D., Masutti Bartolomeu, Montes Ana, Sanchez Jose Miguel, Provencio Mariano, Viñolas Nuria, Paz-Ares Luis, Lopez- Vivanco Guillermo, Muñoz Miguel Angel, Felip Enriqueta, Alberola Vicente, Camps Carlos, Domine Manuel, Sanchez Jose Javier, Sanchez-Ronco Maria, Danenberg Kathleen, Taron Miquel, Gandara David and Rosell Rafael *Customized cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expresion: a phase III trial in non-small cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(18).
269. Takeshita, M., et al., *CHFR expression is preferentially impaired in smoking-related squamous cell carcinoma of the lung, and the diminished expression significantly harms outcomes*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(7): p. 1623-30.
270. Privette, L.M., et al., *Loss of CHFR in human mammary epithelial cells causes genomic instability by disrupting the mitotic spindle assembly checkpoint*. *Neoplasia*, 2008. **10**(7): p. 643-52.
271. Satoh, A., et al., *Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8606-13.
272. Hanna, N., et al., *Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(9): p. 1589-97.
273. Weiss, G.J., et al., *The impact of induction chemotherapy on the outcome of second-line therapy with pemetrexed or docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(3): p. 453-60.
274. Itaya, T., et al., *Influence of histological type, smoking history and chemotherapy on survival after first-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(2): p. 226-30.
275. Douillard, J.K., E ; Hirsh, V ; Mok, T ; Socinski, M ; Gervais, R ; Wu, Y ; Li, L ; Sellers, M; Lowe, E, *Gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer pre-treated with platinum-based chemotherapy: a randomized, open-label Phase III study (INTEREST)*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2007. **2**: **S305 (abstr PRS-302)**.
276. Benhar, M., et al., *Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(20): p. 6913-26.
277. Benhar, M., D. Engelberg, and A. Levitzki, *Cisplatin-induced activation of the EGF receptor*. *Oncogene*, 2002. **21**(57): p. 8723-31.
278. Friedmann, B.J., et al., *Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(2): p. 209-18.
279. Feng, F.Y., et al., *Role of epidermal growth factor receptor degradation in gemcitabine-mediated cytotoxicity*. *Oncogene*, 2007. **26**(23): p. 3431-9.
280. Yang, S., et al., *Association with HSP90 inhibits Cbl-mediated down-regulation of mutant epidermal growth factor receptors*. *Cancer Res*, 2006. **66**(14): p. 6990-7.