



Patró de metilació d'un panell de biomarcadors en l'adenocarcinoma pulmonar

Marc Gallegos Marmolejo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PATRÓ DE METILACIÓ PER A UN PANELL DE BIOMARCADORS EN L'ADENOCARCINOMA PULMONAR

MARC GALLEGOS MARMOLEJO

Tesi Doctoral

ATGG
GTTT
AUGU
U
UAT
T
TATAGG
TGUU
UUAUTU
GAAATGGGT
TAUG
UUUATTTATA
GGTGUUUUAUTUGAAA
ATGG
GTTTAUGUUUATTTA
TAGGTGUUUUAUTUGAAAATG
GGT
TAUGUUUATTTATAGGTGUU
UUAUTUGAAAATGGGTTAUGU
UUUA
TTTATAGGTGUUUUAUTUGAAA
ATGGGTTAUGUUUATTTATAG
GTGU
UUUATTTATAGGTGUUUUAUTUGA
AAATGGGT
TAUGUUUATTTATAGGTGUUUUA
UUUATTTATAGGTUGAAAATGGGTTG
UUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUUU
ATTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUUUATTTATAGGTGUUUUA
AAATGGGT
TAUGUUUATTTATAGGTGUUU
UATTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGG
GAAATGGGT
TAUGUUUATTTATAGGT
TTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGT
AAATGGGT
TAUGUUUATTTATAGGTGUUU
GGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUUUU
UGUUUATTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATG
AAATGGGT
TAUGUUUATTTATAGGTGUUUUA
UUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUUUATTTAT
TTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTAUG
TTAUGUUUATTTATAGGTGUUUUAUTUGAAA
TUGAAAATGGGTTAUGUUUATTTATAGGTGU
TATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUU
TTAUGUUUATTTATAGGTGUUUUAUTUGAAA
AUTUGAAAATGGGTTAUGUUUATTTATAGGT
TTTATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTAUG
TTAUGUUUATTTATAGGTGUUUUAUTUGA
UTUGAAAATGGGTTAUGUUUATTTATAGG
ATAGGTGUUUUAUTUGAAAATGGGTTA
GTTTAUGUUUATTTATAGGTGUUUUA
UUUUAUTUGAAAATGGGTTAUGUU
GTTTAUGUUUATTTATAGGTG
UGUUUATTTATAGG
AAATGGGT
UUA



Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona
Programa de Doctorat de Biomedicina

Patró de metilació d'un panell de biomarcadors en l'adenocarcinoma pulmonar

Memòria presentada per
Marc Gallegos Marmolejo
per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquesta Tesi ha estat realitzada al Laboratori de Recerca Translacional de
l'Institut Català d'Oncologia (ICO) formant part de l'Institut d'Investigació
Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

El director

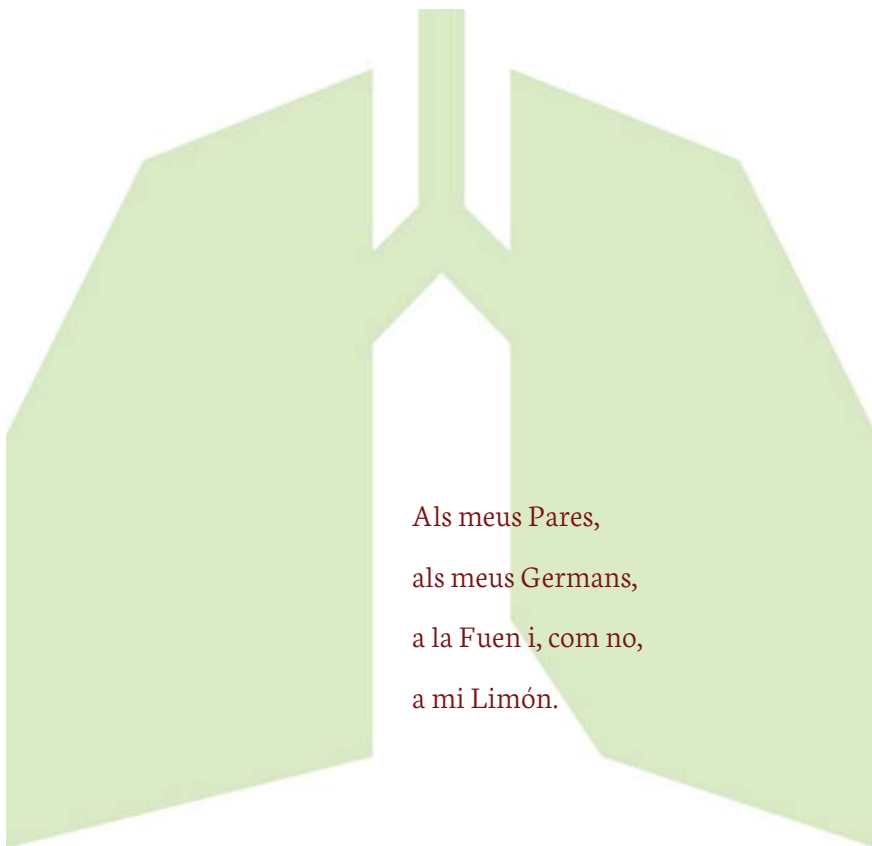
El tutor

El doctorand

Dr. Gabriel Capellà

Dr. Francesc Viñals

Marc Gallegos



Als meus Pares,
als meus Germans,
a la Fuen i, com no,
a mi Limón.

AGRAÏMENTS

“El temps corre sense cames”, aventura sempre un estimat amic i no s’equivoca.

Ja ha arribat el dia que molts albiraven com una entelèquia. Moment en el qual és temps de fer una mica de revista i mirar enrere abans d’assestar el cop de gràcia a un període, llarg període, que malgrat moltes vegades haver fet de l’estoïcisme, una virtut que desconeixia; m’ha fet créixer com a home de ciència i com a persona. Això no ha succeït per casualitat i es deu bàsicament al *imprinting* de les persones que m’han permès nodrir-me i gaudir del seu coneixement, sentiments, companyia i afecte.

Fent-me meu un símil en el qual un company afirmava que els agraïments individualitzats d’una tesi, són com aquell acudit reeixit que et demanen explicar i tothom centra l’atenció en tu amb no poques expectatives de riure; i, on en aquell mateix instant, saps que al final no farà gens de gràcia. Amb aquesta premissa, feta a mida, aquí m’espolso aquesta responsabilitat i evito un possible “*coitus interruptus*” o més catòlicament dit, una llufa d’agraïments.

Abans de començar la verborrea, emfatitzar el sentiment de família que em resta (per bo i per dolent) de les persones que vam coincidir al LRT i on moltes vegades procedia la dita de, “la confiança fot fàstic”. D’aquí, que el sentiment que aflora ara, rematant definitivament aquesta Tesi, és el de tall del cordó umbilical, i m’explico, el sentiment de trencar definitivament la unió física i romandre ja per sempre la unió més sentimental.

Per tant, després d'aquest literari pròleg, repassaré fets i actes on la gent que m'ha acompanyat es podrà veure reflectida i agraïda per part meva.

I els que no...Eh!, la vida!

Primer de tot agrair al meu director de tesi, com es menester, l'oportunitat d'haver pogut realitzar aquesta tesi i sobretot pel suport i esforç "extraescolar" d'aquest últims mesos per tal de poder posar punt i final a aquesta maratón. I al meu tutor, que quan tenia un dubte o necessitat el dia anterior ja m'ho havia solucionat.

A la gent que quan vaig entrar en aquell inhòspit i laberíntic hospital, el dia de gràcia del 25 d'abril del 2006, dia en el qual feia 23 anys, em va acollir, aconsellar, ensenyar i mimar fins, i més enllà, a la meua marxa cap a la definitiva localització.

A la gent amb la qual vaig compartir feina i vida a Madrid dels quals vaig aprendre moltíssim i amb la qual ha quedat una entranyable amistat.

Aquells que em van pràcticament adoptar; que a part de facilitar-me material d'estranguis, riures, safareig i coneixement, dels que són considerats tota una institució a la casa i, a sobre, mai m'han posat mala cara. Com a mínim al davant.

Als que compartíem les nostres "psicopatologia" i humor, anem a denominar negre, mentre donàvem lloc als riures necessaris per tal de sobreviure a extenses tardes d'ordinador oblidats en el millor racó del laboratori, deixant l'estigma de rancietat que alguns ostentaven.

A les rialleres treballadores, d'hores més o menys intempestives, que tan bon punt pipetegen cap per avall com et fan un *lip dub* o un *moonwalker* apadrinades pel pertinent *partener* inquisidor que

gaudeix tot al· legant bogeria. A totes “elles”.

A qui em va donar consell i em cridà a l'ordre en els moments més necessaris, preocupant-se per mi, tot i estar també ben servit.

Aquells que arrasaven amb tot, fos material fungible, animal o persona, però que després eren la festa feta persona i sempre podies comptar amb ells, sobre tot per les celebracions.

A tots amb els que gaudíem de la màquina de cafè, els dinars i les sortides; és impressionant el que es troba a faltar aquests moments amb vosaltres. Ara em sorprèn l'excursionisme eclecticisme de les temàtiques, serioses o futeses. Ja hagués volgut Tele5 aquestes tertúlies.

Amb els que més enllà de les parets del laboratori em continuat compartint el nostre temps amb *whiskys*, filosofia barata de bar, piscina, aniversaris, concerts i sardinades.

Als que en els moments de patetisme moral em van acotxar, sorprendre i amb la seva paciència i afecte em van animar. Els que dia a dia estan lluny, 15, 100 i 6500Km però sempre han estat i estaran a prop.

A la que en les hores de bruixa et netejava amb la seva escombra sota els peus, demanant amb afectuosa impertinència que m'apartés, tot i estar tot el laboratori buit; però que tantes vegades em va treure d'un destret.

A la persona que fa que els teus somnis artisticocientífics es puguin transformar en realitat com qui bufa i fa ampolles, mentre et suporta diàriament, tot i donar-li la brasa amb pantones, programes i opinions, tot estant fins al capdamunt de feina. I em pregunto, serà resignació?

A tots els amics, els meus pares i germans, en la trinxera d'aquest front de treball, que han estat el pilar del meu dia a dia, a casa, a Girona, arreu i tothora, malgrat que en molts moments els hagués definit com a corcons. Els que sempre han etzibat un espavila!, encara no?, ja llegeixes?, per a quan? Per a ells, doncs ja ha arribat!

A totes elles i ells, moltes, moltíssimes gràcies.

Però com en tota regla sempre hi ha excepcions; tres excepcions, tres persones que tenen causa i efecte directe de que jo ara mateix estigui redactant aquestes lletres i no hagués defallit pel camí. A vosaltres dir-vos que m'agradaria ser més amic de la paraula escrita, com sé que en gaudiu un parell de vosaltres, per tal de demostrar-vos l'estima que us professo, però prego us conformeu amb les paraules que aquí espeten de manera improvisada.

A la **Marga**, Margarita. La que considero la meva mentora i més que una amiga. Que tanmateix no sé si estava bé o no va calcular en la seva justa mesura el dia que va decidir agafar les regnes de la meva adolescent vida laboral i científica, i per tant hipotecar part de la seva credibilitat. Per totes les amenaces rebudes de dormir a l'era, el teu afany de culturalitzar-me, els ral·lis per Barcelona i per moltes més coses que han esdevingut, moltes gràcies.

A l'**Ernest**, el meu Samuel. Crec que no m'equivoco quan afirmo que és la persona que més sabrà que representa culminar aquesta tesi. El meu germà científic i estimat amic, el qual sempre he imaginat en la nostra Odissea de la metilació, representant-nos un ser bicèfal amb

els nostres caps fent-se companyia en tot moment. Creu-me que mentre escric aquestes línies els ulls se m'humitegen pensant en tot el que hem compartit entre alegries i dificultats durant aquests anys. Per això, i per tots el teus consells docents i personals, “desastres de poiata”, consultes mèdiques surrealistes, balls d'homenatge fortuits, tecnicismes estimulants i sobretot la gran persona que ets, moltes gràcies.

I finalment a la **Gemma**, la Puey, mi “medio Limón”. Ets la rialla feta persona que vaig conèixer en aquell gris hospital d'arquitectura brutalista el qual vam compartir durant quatre anys. Quatre anys en els quals vas ser la meva companya de feina, amiga i, qui ho havia de dir, ara “l'afortunada” que m'aguanta totes les “neures”, paranoies i burrades, que com molts ja coneixeu i donareu fe, no són poques. Gràcies per la teva santa paciència, comprensió i lo molt que noto que m'estimes. Gràcies per ser la primera línia de pressió, per haver fet de l'acabar aquesta tesi una empresa teva. Gràcies per riure sempre dels meus acudits, fins i tot quan a ningú li fan gràcia. Gràcies per la teva dedicatòria de tesi, que fa que m'entrin sempre coses al ulls. Gràcies per estar sempre. En definitiva, moltíssimes gràcies per compartir la teva vida amb mi.

Ara ja no tinc l'excusa de la tesi...i en resposta a la teva pregunta.

Si, si que vull sortir aquesta nit!

“La primera gran virtut de l'home va ser el dubte,
i el primer gran defecte la fe”

Carl Sagan (1934 - 1996)

ÍNDEX

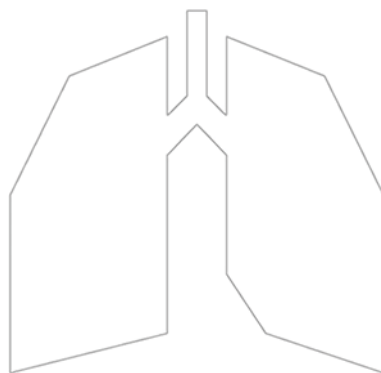
| | | |
|------------|---|----|
| 1. | ABREVIATURES | 3 |
| 2. | HIPÒTESI | 9 |
| 3. | OBJECTIUS..... | 13 |
| 4. | INTRODUCCIÓ | 17 |
| 4.1. | EL CÀNCER. | 17 |
| 4.1.1. | Situació actual..... | 17 |
| 4.1.2. | Bases cel·lulars i moleculars del càncer. | 19 |
| 4.1.2.1. | Model de Hanahan i Weinberg | 19 |
| 4.1.2.2. | Model de Vogelstein i Kinzler..... | 24 |
| 4.2. | EPIGENÈTICA. | 26 |
| 4.2.1. | La metilació..... | 27 |
| 4.2.1.1. | La hipometilació..... | 28 |
| 4.2.1.2. | La hipermetilació..... | 29 |
| 4.2.1.3. | Mecanismes de silenciament per hipermetilació. | 31 |
| 4.2.2. | miRNAs..... | 32 |
| 4.3. | EL CÀNCER DE PULMÓ..... | 34 |
| 4.3.1. | Epidemiologia..... | 34 |
| 4.3.2. | Factors de risc..... | 35 |
| 4.3.2.1. | Tabaquisme..... | 35 |
| 4.3.2.2. | Susceptibilitat genètica | 36 |
| 4.3.2.3. | Ambient i exposició laboral..... | 37 |
| 4.3.3. | Classificació histològica..... | 37 |
| 4.3.3.1. | Carcinoma de cèl·lula petita..... | 38 |
| 4.3.3.2. | Carcinoma de cèl·lula no petita..... | 39 |
| 4.3.3.2.1. | Carcinoma de cèl·lules escamoses..... | 39 |
| 4.3.3.2.2. | Adenocarcinoma pulmonar..... | 39 |
| 4.3.3.2.3. | Carcinoma indiferenciat de cèl·lules grans..... | 40 |
| 4.3.4. | Estadificació..... | 41 |
| 4.3.4.1. | Descriptors TNM - Sistema internacional d'estadificació TNM -estadis 2009 (7 ^a edició)..... | 42 |
| 4.3.4.1.1. | T (Tumor primari) | 42 |

| | | |
|------------|---|----|
| 4.3.4.1.2. | N (Ganglis limfàtics regionals)..... | 43 |
| 4.3.4.1.3. | M (Metàstasi a distància) | 44 |
| 4.3.5. | Tractaments. | 47 |
| 4.3.5.1. | Cirurgia..... | 47 |
| 4.3.5.2. | Quimioteràpia..... | 47 |
| 4.3.5.3. | Radioteràpia..... | 48 |
| 4.3.5.4. | Estratègia terapèutica basada en l'estadiatge. | 49 |
| 4.3.6. | Alteracions moleculars en CP. | 51 |
| 4.3.6.1. | L'adenocarcinoma pulmonar· lesions preneoplàsiques, bases moleculars i alteracions epigenètiques. | 52 |
| 4.3.6.2. | La lesió premaligne i preinvasiva. | 52 |
| 4.3.6.3. | L'epiteli bronquial com a precursor de l'ADC. | 54 |
| 4.3.7. | El paper dels miRNAs en el desenvolupament del CP. | 57 |
| 4.3.8. | Alteracions epigenètiques en CP. | 59 |
| 4.4. | TÈCNiques D'ANÀLISI DE LA METILACIÓ..... | 60 |
| 4.4.1. | Illes CpG. | 60 |
| 4.4.2. | Mètode basats en la PCR..... | 61 |
| 4.4.2.1. | Tractament de bisulfit sòdic base dels estudis de PCR..... | 62 |
| 4.4.2.2. | Tècniques basades en el disseny de <i>primers</i> amb criteri MSP..... | 64 |
| 4.4.2.2.1. | PCR específica de metilació (MSP)..... | 65 |
| 4.4.2.2.2. | MSP quantitatives, Metylight. | 65 |
| 4.4.2.2.3. | Basades en SYBR-Green o SMART-MSP. | 65 |
| 4.4.2.3. | Tècniques basades en el disseny de <i>primers</i> amb criteri MIP..... | 67 |
| 4.4.2.3.1. | Seqüenciació genòmica per bisulfit. | 68 |
| 4.4.2.3.2. | Piroseqüència. | 68 |
| 4.4.2.3.3. | Combinació de bisulfit amb anàlisi de restricció (COBRA)..... | 69 |
| 4.4.2.3.4. | MS-SnuPE..... | 70 |
| 4.4.2.3.5. | Heavymethyl. | 71 |
| 4.4.2.3.6. | Anàlisi per corbes de fusió (Melting Curve Analysis o MCA)..... | 71 |
| 4.4.2.3.7. | MS-HRM..... | 72 |
| 5. | MATERIALS i MÈTODES..... | 77 |
| 5.1. | PROCESSAMENT I PREPARACIÓ DE MOSTRES | 77 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| 5.3.2.1.1. | Condicions | 104 |
| 5.3.2.1.2. | Disseny <i>primers</i> | 105 |
| 5.3.2.2. | Melting Curve Assay (MCA) | 106 |
| 5.3.2.2.1. | Condicions | 107 |
| 5.3.2.2.2. | Disseny <i>primers</i> | 108 |
| 5.3.2.3. | Gradient de temperatures d'annealing | 108 |
| 5.3.3. | Caracterització de la Bisulfite Specific-Melting Curve Analysis (BS-MCA) | 109 |
| 5.3.3.1. | Disseny de <i>primers</i> | 110 |
| 5.3.3.2. | Condicions | 114 |
| 5.3.3.3. | Caracterització de la sensibilitat analítica | 115 |
| 5.3.3.3.1. | Gradient de dilucions | 115 |
| 5.3.3.3.2. | Assaig de clons | 116 |
| 5.3.3.4. | Caracterització de l'especificitat | 120 |
| 5.3.3.4.1. | BCORA | 120 |
| 5.3.3.4.2. | Comparativa d'agents fluorescents intercalants | 122 |
| 5.3.3.4.3. | Correlació entre el nombre d'adquisicions en la corba de fusió i la resolució | 122 |
| 5.3.4. | Anàlisi d'un panell de marcadors en ADC per BS-MCA | 123 |
| 5.3.4.1. | Sèrie mostral | 123 |
| 5.3.4.2. | Marcadors analitzats | 123 |
| 5.3.4.3. | Disseny de <i>primers</i> | 124 |
| 5.3.4.4. | Condicions | 127 |
| 5.3.4.5. | Anàlisi estadístic | 128 |
| 6. | RESULTATS | 133 |
| 6.1. | ESTUDI PLAMET | 133 |
| 6.1.1. | Estudi preliminar de l'estat de metilació de gens supressors tumorals en mostres no invasives | 133 |
| 6.1.1.1. | Esputs | 134 |
| 6.1.2. | Estudi de l'estat de metilació de miRNAs en línies cel·lulars i mostres no invasives | 135 |
| 6.1.2.1. | mir-124a1 | 135 |
| 6.1.2.1.1. | Estudi en línies cel·lulars | 135 |
| 6.1.2.1.2. | Sèrums | 137 |
| 6.1.2.1.2.1. | MSP | 137 |
| 6.2. | COMPARATIVA MSP/MCA | 138 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 6.2.1. | Anàlisi de 20 mostres aparellades tumor / no tumor..... | 139 |
| 6.2.1.1. | Estat de metilació del promotor gènic dels marcadors <i>TMSI</i> , <i>APC</i> i <i>RASSF1A</i> per MSP i MCA en 20 aparellats. | 139 |
| 6.3. | CARACTERITZACIÓ DE LA BS-MCA..... | 141 |
| 6.3.1. | Disseny de <i>primers</i> | 142 |
| 6.3.2. | Sensibilitat analítica..... | 144 |
| 6.3.2.1. | Gradient de dilucions..... | 145 |
| 6.3.2.2. | Assaig de clons..... | 146 |
| 6.3.2.3. | Nombre d'adquisicions durant el MCA..... | 151 |
| 6.3.3. | Especificitat analítica..... | 153 |
| 6.3.3.1. | BCORA..... | 153 |
| 6.3.3.2. | Agents intercalants..... | 155 |
| 6.4. | ANÀLISIS D'UN PANELL DE BIOMARCADORS EN ADC..... | 157 |
| 6.4.1. | Especificitat de la metilació en el teixit tumoral..... | 158 |
| 6.4.2. | Anàlisi d'un panell de marcadors en mostres d'ADC..... | 158 |
| 6.4.2.1. | Anàlisi estadístic estadis I - IV..... | 159 |
| 6.4.2.1.1. | Correlació dels marcadors amb les dades clinicopatològiques..... | 159 |
| | Veure pàgina següent a la Taula 12..... | 159 |
| 6.4.2.1.2. | Anàlisi de supervivència per corbes Kaplan-Meier (Figura 39)..... | 161 |
| 6.4.2.1.3. | Anàlisi Univariant i Multivariant dels marcadors significatius..... | 162 |
| 6.4.2.1.3.1. | <i>CDH13</i> per regressió de Cox..... | 162 |
| 6.4.2.1.3.2. | miR-34b/c per regressió de Cox..... | 162 |
| 6.4.2.2. | Anàlisi estadístic estadis I - II..... | 163 |
| 6.4.2.2.1. | Anàlisi Univariant de Supervivència Global (SG) i Supervivència Lliure de Malaltia (SLM)..... | 164 |
| 6.4.2.2.2. | Anàlisi multivariant de SG i SLM ajustat a sexe, estadi i edat..... | 165 |
| 7. | DISCUSSIÓ..... | 169 |
| 7.1. | ESTUDI INICIAL PLAMET..... | 170 |
| 7.2. | SELECCIÓ DE LA TÈCNICA..... | 172 |
| 7.3. | CARACTERITZACIÓ DEL BS-MCA..... | 174 |

| | | |
|------|--|-----|
| 7.4. | ANÀLISI D'UN PANELL DE BIOMARCADORS DE METILACIÓ EN ADC..... | 177 |
| 7.5. | CONSIDERACIONS FINALS..... | 182 |
| 8. | SUMARI..... | 187 |
| 9. | CONCLUSIONS..... | 191 |
| 10. | BIBLIOGRAFIA..... | 195 |
| 11. | TAULES..... | 215 |
| 12. | FIGURES..... | 217 |



ABREVIATURES

RUGTTTAAUUUGURGTTTTAUTCATAGAUATTTATTTUUURUTTGGTTUUUTR TTTARTGTTTUUTGTAUTGGGGG

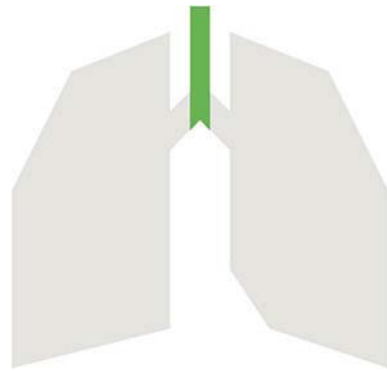
| | |
|--------------|---|
| DNMT | DNA metiltransferasa |
| EBUS | Aspiració amb agulla per ultrasò endobronquial |
| G | Guanina |
| GST | Gens supressors de tumors |
| HDAC | Histona deacetilasa |
| HRM | <i>Melting</i> d'alta resolució |
| IARC | Agència internacional per a la recerca en càncer |
| IASLC | Associació Internacional per a l'Estudi del Càncer de Pulmó |
| LC | <i>Lightcycler</i> |
| LOH | Pèrdua d'heterozigositat |
| MBD | Dominis d'unió per grups metil (<i>methyl binding domain</i>) |
| MCA | Anàlisi per corba de <i>melting</i> |
| mCpG | CpG metilada |
| MIP | <i>Primers</i> independents de l'estat de metilació |
| MPOC | Malaltia pulmonar obstructiva crònica |
| MSP | PCR específica de metilació |
| nonBS | <i>primers</i> sense característiques Bisulfit específic |
| OMS | Organització Mundial de la Salut |
| pb | Parells de bases |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa |
| PET | Tomografia per emissió de positrons |
| RNA | Àcid ribonucleic |

| | |
|-------------|---|
| RT | Radioteràpia postoperatòria |
| SCC | Carcinoma de cèlules escamoses |
| TBNA | Aspiració per agulla transbronquial |
| TC | Tomografia computeritzada |
| TNM | Sistema internacional d'estadificació TNM |
| UICC | Unió internacional contra el càncer |

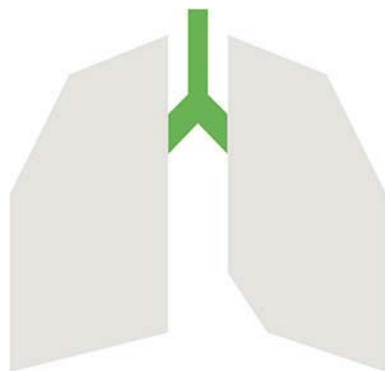


HIPÒTESI

RUGTTTRUUUGURGTTTTTRUTGATAGRUATTTATTTUUURUTTGGTTUUUTTTTAGATT GTTUUTGTGAGATGTTTUUTGTUATGGGGG



RUGTTTAAUUUGURGTTTTAUTCATAGAUATTTATTTUUURUTTGGTTUUUTTTTGRA **OBJECTIUS** GTTTTTGAGATGTTTUUTGATG6666



INTRODUCCIÓ

RUGTTTRUUUGURGTTTTRAUTGATAGAUATTTATTTUURUTTGGTTUUUTTT TAGATGAGATGTTTUU TGATG6666

es produeix a nivell dels epitelis i aquests, a més, són els que estan més sotmesos a lesions físiques i químiques que afavoreixen el càncer.

A més del component genètic, l'ambient és un factor molt important a l'hora de determinar la probabilitat de patir un determinat tipus de càncer. Durant molts anys s'han realitzat estudis epidemiològics que han posat de manifest diferents índexs d'incidència en funció de la situació geogràfica. Per exemple, el càncer de còlon, mama i pròstata són més comuns als països desenvolupats que no pas als subdesenvolupats, probablement pels hàbits alimentaris i per la contaminació industrial. En canvi, altres càncers intestinals estan més arrelats al món subdesenvolupat probablement pel tipus de cocció dels aliments. Pel que fa al càncer de pulmó s'observa que la incidència és força semblant arreu del món degut a la globalització del consum del tabac. En general, la incidència i mortalitat del càncer està incrementant, tot i els recents avenços en el seu tractament (Cancer Facts & Figures 2007).

El càncer és un problema important tant de salut pública com socioeconòmic arreu del món. Una de cada vuit morts al món es deu al càncer i, mundialment és la segona causa de mort en els països econòmicament desenvolupats (després de les malalties del cor) i la tercera en països subdesenvolupats (després de les malalties del cor i diarrees). Cada any es diagnostiquen a Europa 2,9 milions de nous casos de càncer, dels quals 1,7 milions de pacients moren com a causa de la malaltia [1]. Una cinquena part del número total de morts per càncer s'atribueix al càncer de pulmó. El càncer colorectal és la segona major causa de morts per càncer (12,2%), seguit pel càncer de mama (7,8%) i el d'estómac (6,9%).

4.1.2. Bases cel·lulars i moleculars del càncer.

Es diu que el càncer té un origen monoclonal perquè prové d'una anomalia que es produeix, inicialment, en una sola cèl·lula, malgrat no es pot descartar la policlonalitat cel·lular. Ara bé, una sola mutació no provoca la transformació maligna sinó que s'estima que calen entre 3 i 7 successos independents a l'atzar, cadascun amb baixa probabilitat, per tal que una cèl·lula normal es transformi en cancerosa. Aquestes mutacions poden aparèixer espontàniament, es poden heretar o bé poden ser promogudes per agents externs com són virus, radiacions i agents químics, els quals a més augmenten la freqüència natural de les mutacions.

Durant l'última dècada s'han proposat dues hipòtesis principals i que són complementàries per a respondre a la pregunta de com es dona el procés de transformació maligne: una primera, situada en un context més cel·lular i formulada per Hanahan i Weinberg [2, 3]; i una segona, en aquest cas en un context més genètic, plantejada per Vogelstein i Kinzler [4].

4.1.2.1. Model de Hanahan i Weinberg.

Hanahan i Weinberg [2, 3] van suggerir que la majoria dels càncers són la manifestació de 6 alteracions essencials de la fisiologia cel·lular que, conjuntament, determinen el creixement maligne. Aquestes capacitats adquirides són [5].

- Autosuficiència en senyals de creixement.

Per a que una cèl·lula normal passi d'estar en quiescència a un estat proliferatiu són necessaris senyals de creixement. Aquests es transmeten a l'interior de la cèl·lula mitjançant receptors de membrana als quals s'hi uneixen molècules senyalitzadores (ligands)

com factors de creixement, components de la matriu extracel·lular i molècules d'adhesió. En les cèl·lules tumorals es produeix una autosenyaltzació mitjançant l'alteració de factors de creixement extracel·lulars (adquisició de l'habilitat de sintetitzar els propis factors de creixement creant un feed-back positiu o estimulació autocrina, per exemple TGF- β), l'alteració de transductors de membrana (mutació o sobreexpressió de molts receptors de membrana als que s'uneixen aquests factors de creixement, per exemple EGFR o HER2/neu), o l'alteració dels circuits intracel·lulars que tradueixen els senyals (alteracions estructurals de proteïnes de les cascades de senyalització com SOS-Ras-Raf-MAPK).

- Insensibilitat als senyals inhibidors de creixement.

En un teixit normal, existeixen múltiples senyals antiproliferatius que mantenen la quiescència cel·lular i l'homeòstasi del teixit. Aquests senyals també es transmeten mitjançant receptors de membrana acoblats a circuits de senyalització intracel·lulars. Els circuits que permeten respondre a les cèl·lules normals a aquests senyals inhibidors estan relacionats majoritàriament amb el control del cicle cel·lular preferentment en el seu per G1. Les cèl·lules tumorals han d'evadir aquests senyals per poder proliferar. Un exemple serien les alteracions dels gens involucrats en la via de senyalització de la proteïna del retinoblastoma (pRb), que impliquen la insensibilitat a factors inhibidors del creixement.

- Evasió de l'apoptosi.

L'habilitat de les cèl·lules tumorals per expandir-se, o el que és el mateix, d'un tumor per créixer, depèn del balanç entre la taxa de proliferació i la de pèrdua cel·lular. La mort cel·lular programada o apoptosi representa la font principal d'aquesta pèrdua que es dona com a conseqüència de danys cel·lulars. La resistència a l'apoptosi pot ser adquirida a través de diverses estratègies però la més comuna és a través de mutacions al gen p53, un component clau en la detecció de danys en el DNA cel·lular que indueix la cascada efectora apoptòtica.

- Potencial replicatiu il·limitat.

Un cop les cèl·lules normals arriben a un nombre determinat de divisions, aturen el seu creixement per entrar en senescència. Els telòmers estan formats per centenars de repeticions de 6 pb (TTAGGG). Durant cada cicle cel·lular es perden 50-100pb en la replicació del DNA telomèric. Aquest escurçament dels telòmers durant successius cicles de replicació té un límit i desemboca inevitablement en la mort cel·lular. Pràcticament tots els tumors adquireixen la capacitat de mantenir constant la mida dels seus telòmers aconseguint d'aquesta manera l'estat d'immortalització. La majoria de tumors ho fan mitjançant la sobreexpressió de la telomerasa.

- Manteniment de l'angiogènesi.

La formació de nous vasos sanguinis es dona tant en situacions normals com durant el desenvolupament embrionari, cicatrització de ferides o durant el cicle reproductor de la dona. L'oxigen i els nutrients

proporcionats per la vasculatura són crucials per la funció cel·lular i la seva supervivència. Com qualsevol altre teixit els tumors també necessiten aquesta aportació, per això solen promoure l'angiogènesi alterant la transcripció de certs gens com per exemple el factor de creixement vascular endotelial (VEGF), que actua com a senyal iniciador de la formació de vasos sanguinis.

- Invasió de teixits i metàstasi.

Tard o d'hora en la progressió tumoral algunes cèl·lules escapen del tumor primari, entren al torrent sanguini o limfàtic i envaeixen nous teixits adjacents o distants. La funció de proteïnes relacionades amb l'adhesió cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular com l'E-cadherina es perd en la majoria de cèl·lules epitelials en el front d'invasió (epiteli-mesènquima) i en el procés de metastatització. Gens que codifiquen per proteases es sobreexpressen, inhibidors de proteases s'infraexpressen, i formes inactives de proteases s'activen en les cèl·lules tumorals per poder colonitzar els teixits. Els assentaments de cèl·lules a distància és el que es coneix com a metàstasi, i és la causa del 90% de les morts per càncer.

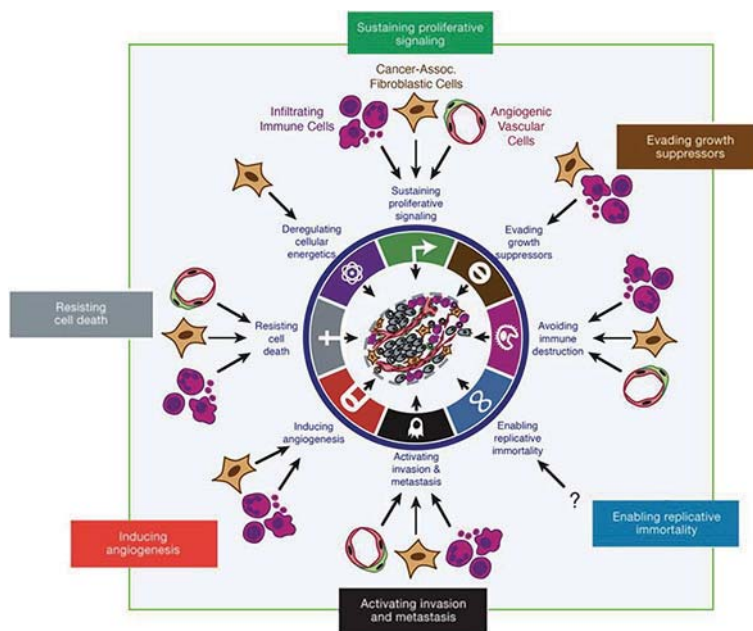


Figura 1. Mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del càncer. Funcions adquirides per les cèl·lules en el microambient tumoral i mecanismes moleculars implicats. Modificat de *Hanahan i Coussens, 2012* en consonància amb *Hanahan i Weinberg, 2011*.

La creixent investigació desenvolupada està proposant nous atributs en la cèl·lula cancerosa funcionalment importants per al desenvolupament del càncer. Són les considerades característiques emergents, que amplien el model de Hanahan i Weinberg [2, 3] detallat a la Figura 1. Una es basa en la reprogramació del metabolisme energètic de la cèl·lula per tal de donar suport al creixement i la proliferació cel·lular contínua. La segon implica l'evasió del sistema immunitari, evitant l'atac i l'eliminació per part en particular per limfòcits T i B, macròfags, i NK. Aquest fet posa de manifest el rols dicotòmic del sistema immunològic que tant antagonitza com millora

el desenvolupament i progressió tumoral. Les dues següents es consideren conseqüència de la neoplàsia. La inestabilitat genòmica i mutació condueix a les cèl·lules canceroses juntament amb les alteracions genètiques a la progressió tumoral. I la inflamació, a causa de les cèl·lules del sistema immunitari innat destinades a combatre les infeccions donen lloc accidentalment al suport de múltiples capacitats de diferenciació.

4.1.2.2. Model de Vogelstein i Kinzler.

En el segon model, Vogelstein i Kinzler [4] destaquen que, a diferència d'altres malalties genètiques, el càncer no es pot atribuir al defecte d'un sol gen. Els múltiples mecanismes de control presents en mamífers impliquen que només quan s'alteren diferents gens és possible el desenvolupament del càncer. Els autors proposen que hi ha 3 grans grups de gens responsables del procés tumoral.

- Oncogèns.

Són gens la funció dels quals acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular ordenada, però també regulen altres funcions clau de la cèl·lula com la supervivència o el grau d'apoptosi. Les mutacions en aquests gens confereixen un guany de funció o una activació constitutiva que donarà lloc a un creixement descontrolat, invasivitat i malignitat de les cèl·lules. Poden ser oncogèns aquells gens que codifiquen per a receptors de membrana amb activitat tirosina-quinasa, membres de vies de transducció de senyals, factors de transcripció o proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular. La mutació en aquests tipus de gens té un efecte

dominant, per tant una sola mutació en una de les dues còpies del gen és suficient per provocar dins la cèl·lula un avantatge de creixement. Exemples d'oncogenes són RAS, MYC, SRC i EGFR.

- Gens supressors de tumors.

La funció principal d'aquests gens és la de controlar la proliferació cel·lular. A diferència dels oncogenes, les mutacions puntuals, translocacions i amplificacions en aquests gens redueixen l'activitat del seu producte. Els gens supressors de tumors són de caràcter recessiu, és a dir, cal la inactivació d'ambdues còpies del gen per a silenciar-los. La majoria d'aquests gens codifiquen per proteïnes de reparació del DNA i control del cicle cel·lular. Alguns dels gens supressors de tumors freqüentment alterats en càncer són els del retinoblastoma (RB) i el de la p53 (TP53) per diferents mecanismes d'inactivació, bé per silenciament, mutacions o LOH.

- Gens estabilitzadors.

La seva funció normal no està relacionada amb funcions de regulació de la proliferació sinó amb el manteniment de la integritat del genoma. La seva mutació implica un increment en l'acumulació de mutacions de la cèl·lula. Per tant, tots els gens poden ser afectats per la mutació d'aquests, però només les mutacions en els dos tipus de gens que s'acaben de mencionar afectaran el balanç net de creixement conferint un avantatge selectiu a les cèl·lules mutades. Normalment, també és necessària la inactivació dels dos al·lels perquè en resulti un efecte fisiològic. Un exemple és BRCA1.

Les mutacions d'oncògens i gens supressors de tumors operen de manera similar a nivell fisiològic: contribueixen al procés tumoral incrementant l'estimulació de la divisió cel·lular, la inhibició de l'apoptosi o eludint els punts de control del cicle cel·lular[4]. Per acumular tots aquests defectes i capacitats adquirides es necessita temps, durant el qual els tumors evolucionen a formes més malignes i més agressives. Aquest fenomen es coneix com a progressió tumoral i ja es va definir per *Foulds* als anys 50, quan va descriure el càncer com un procés a través del qual les cèl·lules evolucionen progressivament des de la normalitat fins a tumors invasius, passant per una sèrie d'estats premalignes [6-8]. Els processos cap a la malignitat són altament variables. Les mutacions en certs oncògens poden ser de les primeres alteracions en algunes vies de progressió tumoral i de les últimes en d'altres. Com a conseqüència, l'adquisició de les diferents capacitats biològiques descrites anteriorment pot aparèixer en diferents moments durant les diferents progressions tumorals. Per tant, la seqüència concreta en què les capacitats són adquirides pot variar molt, tant entre tumors d'un mateix tipus com d'orígens diferents (Figura 1). En qualsevol cas, independentment de com s'adquireixen aquests canvis, les seves conseqüències biològiques finals són compartides per tots els tipus diferents de càncer [2].

4.2. EPIGENÈTICA.

L'epigenètica és un dels camps més prometedors i en expansió en el panorama de la recerca biomèdica actual. Des de l'inici de l'epigenètica en la dècada de 1940, els descobriments sobre les seves conseqüències en la biologia normal i la malaltia no han parat, recopilant una gran quantitat de coneixement en l'última dècada [9].

Inicialment, el càncer es pensava que era només una conseqüència dels canvis genètics en els principals gens supressors de tumors i oncogenes que regulen la proliferació cel·lular, la reparació del DNA, la diferenciació cel·lular i altres funcions homeostàtiques i de l'alteració d'aquests degut a mutacions puntuals, translocacions i amplificacions. No obstant això, l'estudi dels mecanismes epigenètics en el càncer durant l'última dècada com la metilació del DNA, la modificació de les histones, el posicionament de nucleosomes i l'expressió de microRNAs (miRNA), ha proporcionat una àmplia informació sobre els mecanismes que contribueixen al fenotip neoplàstic a través de la regulació de l'expressió de gens crítics per a les vies de transformació. Es pot afirmar que les cèl·lules canceroses tenen un epigenoma específic.

4.2.1. La metilació.

La metilació del DNA consisteix en una addició covalent d'un grup metil en el carboni 5' del l'anell de la citosina, transformant-se en la 5'metil-citosina (5mC), també anomenada la cinquena base nucleotídica. Diferents enzims amb activitat metiltransferasa són capaços de catalitzar la transferència d'un grup metil des del donador SAM (s-adenosilmetionina) cap a la posició 5 prima de la citosina. En vertebrats, la metilació de la citosina es dona bàsicament en el context de la seqüència 5'-CG-3' coneguda com a dinucleòtid CpG [10].

La metilació del DNA té com a funció majoritària a nivell genòmic la supressió de l'activitat dels elements transposables. També s'assumeix un paper regulador transcripcional que suggereix l'existència de gens silenciats per metilació que podrien desmetilar-se i reactivar-se en moments determinats del desenvolupament. No obstant, les tres principals situacions fisiològiques normals en les que la metilació del DNA desenvolupa un

paper clau de mecanisme de silenciament són la inactivació del cromosoma X en mamífers, l'establiment de l'*imprinting* i el silenciament específic de teixit.

4.2.1.1. La hipometilació.

Es refereix el baix nivell global de metilació de les citosines que pertanyen als dinucleòtids CpGs presents als tumors en comparació amb els seus teixits no tumorals aparellats i és una de les alteracions primerenques que es troben en el càncer humà [11]. Des del punt de vista funcional la hipometilació en cèl·lules cancerígenes s'associa amb una sèrie de resultats adversos com la inestabilitat cromosòmica, l'activació d'elements de transposició i la pèrdua de l'empremta genòmica. La disminució de la metilació en seqüències repetitives de DNA en regions pericèntriques dels cromosomes està associat amb un augment dels reordenaments cromosòmics, la recombinació mitòtica i l'aneuploidia [12, 13]. Les seqüències de DNA intragenòmiques i endoparàsites com els elements L1 [14] i repeticions d'elements Alu (seqüència recombinogènica), són silenciats en les cèl·lules somàtiques i es reactiven en el càncer humà on s'ha de sumar la pèrdua de l'imprinting. Actualment està demostrat que les aberracions en els patrons de metilació del DNA de les illes CpG en les regions promotores dels gens supressors de tumors tant per hipometilació com hipermetilació són una característica comuna de les malalties neoplàsiques en humans [15].

4.2.1.2. La hipermetilació.

La hipermetilació del DNA és l'alteració epigenètica més ben caracteritzada en càncer i és el mecanisme més conegut sobre com la metilació del DNA afecta al procés tumoral. Aquesta hipermetilació del DNA s'ha d'analitzar com un procés global, que afecta a regions del genoma concretes i en el qual molts gens es veuen afectats, però només uns quants tindran una significació funcional. Per tant, no tots els gens hipermetilats en càncer mostraran propietats de gens supressors de tumors [16]. Des del moment en què es va descobrir el primer gen hipermetilat en càncer [17] el nombre de gens silenciats per aquest mecanisme no ha deixat d'augmentar equiparant-se al nivell dels gens mutats en càncer [18]. Aquest mecanisme pot involucrar gens en totes les localitzacions cromosòmiques en totes les vies cel·lulars conegudes, implicades en el cicle cel·lular, diferenciació, reparació de DNA, resistència a drogues, detoxificació, apoptosi, angiogènesi i metastasi [19]. Actualment, està ben establert que en una cèl·lula tumoral hi podem trobar més d'un gen afectat per aquesta alteració. Els gens silenciats per aquest mecanisme els podem agrupar en tres classes, els gens supressors tumorals clàssics que ja s'han trobat mutats en la línia germinal de famílies amb síndromes hereditaris de càncer; gens candidats supressors tumorals i els gens trobats en diferents aproximacions per *screening*, la funció dels quals encara es desconeix [20-22]. S'ha observat que la inactivació de la meitat dels gens supressors de tumors que tenen mutacions germinals en aquells individus que presenten algun tipus de càncer hereditari es pot relacionar amb la presència d'hipermetilació d'aquests en càncers esporàdics [23]. En el cas dels gens supressors de tumors, donada

L'associació entre la hipermetilació i la seva inactivació al llarg del procés tumoral, s'ha proposat aquesta alteració com a mecanisme alternatiu a la mutació i pèrdua d'heterozigositat (LOH) en la hipòtesi original de *Knudson* [24]. Establint una estreta relació entre els canvis genètics i canvis en la metilació del DNA que es produeix en alguns casos concrets. Un dels vincles més clars entre els dos tipus d'alteracions té lloc en la inactivació epigenètica dels gens reparadors del DNA. Per exemple, el gen O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), una proteïna reparadora del DNA que es troba freqüentment hipermetilada en càncer de còlon [25]. Aquesta inactivació s'associa a la manca de reparació en les transicions de guanines a adenines en l'oncogen *k-ras* [26] i el gens supressors de tumor *p53* [27]; essent exemple de com una alteració epigenètica inicial condiona la naturalesa molecular de les alteracions genètiques posteriors. El gran nombre de gens hipermetilats i silenciats en càncer ha dut a alguns autors a hipotetitzar l'existència d'un fenotip metilador o CIMP (CpG island methylator phenotype) [28]. Els partidaris de l'existència d'aquest fenotip metilador en càncer argumenten que el gran nombre de gens hipermetilats en càncer obeeix a l'alteració d'algun sistema cel·lular de control d'aquests mecanismes epigenètics. Mentre que el paper de la metilació en el manteniment del silenciament gènic ha estat clarament demostrat durant l'inici de la dècada passada [29], la metilació com a origen del silenciament inicial ha estat molt qüestionada [30], amb la pregunta: "és causa o efecte?". En aquest sentit, diversos treballs han ressenyat la importància d'altres mecanismes en el silenciament inicial dels gens [31, 32]. Els patrons de metilació de les illes CpG no es donen a l'atzar; mentre que la hipermetilació d'alguns

gens es produeix en múltiples tumors, d'altres són metilats de manera molt més específica o restringida [33]. Aquesta distribució no uniforme suggereix que darrere d'aquesta susceptibilitat variable hi podria haver mecanismes que influïrien diferencialment els tumors. Així, s'ha proposat la utilització de perfils d'hipermetilació específics per cada tipus de tumor per tal d'entendre els mecanismes subjacents en l'evolució tumoral, així com la seva possible utilització en la detecció del càncer [27].

4.2.1.3. Mecanismes de silenciament per hipermetilació.

Existeixen dos plantejaments proposats per reprimir la transcripció. El primer planteja la interferència directa del grup metil en la unió entre les proteïnes reguladores de l'expressió i la seqüència seva de DNA. Es coneixen molts factors que s'uneixen el dinucleòtid CpG, i alguns d'aquests no s'hi poden unir quan la seqüència de reconeixement està metilada. Diversos importants estudis importants a favor d'aquesta proposta recolzats en la CTCF, que és un factor de transcripció de tipus Zing-finger (factor d'unió CCCTC)[34].

La segona manera de repressió, oposada a la primera, es produeix un efecte d'atracció envers unes proteïnes determinades. La MeCP2 i les proteïnes que presenten domini d'unió al dinucleòtid CpG metilat (mCpG) MBD1-MBD4. Entre una interacció entre MeCP2 i un complex corepressor en el qual es troba HDAC [35]. També s'ha descrit l'associació de MBD2 amb HDAC [36]. Establint-se un vincle entre la metilació i repressió. Tanmateix, el descobriment que les DNMT també es podien associar directament amb altres proteïnes modificadores d'histones va afegir un esglaió més de complexitat en la relació entre la

metilació del DNA i l'estructura cromatínica [37]. En càncer, de manera general, s'accepta que els complexos repressors estan localitzats a la regió promotora hipermetilada a través de les proteïnes MBD [38]. D'aquesta manera, la metilació actuaria de plataforma per tota una sèrie d'esdeveniments posteriors on hi hauria una modificació seqüencial de les histones (desacetilació, metilació i unió de proteïnes reguladores de la cromatina) que culminarien amb un estat no actiu de la zona promotora.

4.2.2. miRNAs.

Els miRNAs són una classe de petites molècules de RNAs no codificant (de 22 nucleòtids) que regulen l'expressió gènica mitjançant la modulació de l'activitat específica del RNA missatger a través de la unió per parells de bases complementaries. Existeixen molts patrons d'expressió de miRNAs associats a l'especificitat de cada teixits (empremtes de miRNA). Aquesta expressió que es veu comunament alterada en una varietat de càncers, incloent el CP. Els miRNAs han demostrat ser una classe important de biomarcadors basats en els teixits i en treballs recents es mostra que són alliberats al torrent sanguini per les cèl·lules tumorals, cosa que els converteix com a potencials marcadors no invasiu en sang perifèrica. S'han descrit prop de 500 miRNAs humans en espera d'incrementar la llista de candidats en actuals i properes investigacions. És d'interès que els miRNAs poden funcionar com oncògens i com a gens supressors de tumors en funció dels seus gens diana i, per tant, poden ser sobreexpressats o infraexpressats en el transcurs de la malaltia neoplàsica. Només es coneixen amb certesa una minoria dels gens que són objectiu de regulació per part dels miRNAs, mentre que a la majoria se'ls pressuposen les seves dianes.

Molts dels gens regulats per miRNAs es troben amb freqüència en llocs fràgils del genoma, així com les regions de mínima pèrdua d'heterozigositat, regions de mínima amplificació o regions de ruptura, fet que indica que pot tenir un paper important en la patogènesi del càncer [39, 40]. A part del paper que pot desenvolupar en la progressió tumoral, l'expressió de miRNAs també ha estat relacionada amb defectes en el desenvolupament humà. Els canvis en l'expressió miRNAs poden aconseguir-se a través de diversos mecanismes que inclouen les anomalies cromosòmiques, la unió de factors de transcripció i diverses alteracions genètiques [41, 42]. Per posar un exemple, l'expressió i l'activitat del pot ser influenciada pel deteriorament de la maquinària de processament dels miRNAs, com les mutacions en el gen TRBP2 associat a la funció del complex DICER1 en carcinomes esporàdics i hereditaris amb inestabilitat de microsatèl·lits [43, 44].

L'expressió de miRNAs es pot veure afectada per canvis epigenètics, com la metilació d'illes CpG i canvis concomitants en modificacions de les histones. Actualment un gran nombre de treballs han demostrat l'existència d'una àmplia gamma de miRNAs que es comporten com a gens supressors de tumors amb hipermetilació aberrant, identificats en diversos tipus de càncer, suggerint que el perfil de metilació dels miRNAs poden ser una eina útil en el diagnòstic i pronòstic del càncer.

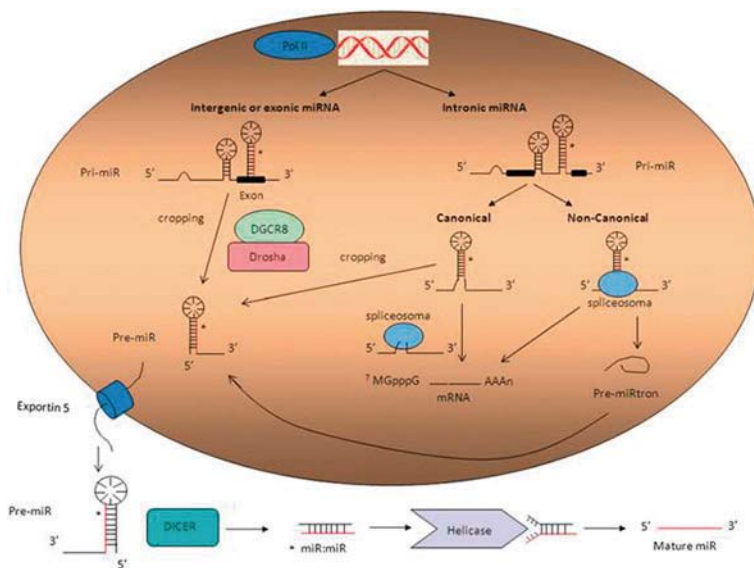


Figura 2. Biogènesi dels miRNA en l'entorn cel·lular. Maquinària, processament i maduració dels miRNA en l'entorn cel·lular. Modificat de Iorio i Croce, 2012.

4.3. EL CÀNCER DE PULMÓ.

4.3.1. Epidemiologia.

El càncer de pulmó (CP) és la primera causa de mort entre homes i dones als Estats Units i Europa. A Europa és la primera causa de mort per càncer en homes i la tercera en dones. La incidència de neoplàsies pulmonars a Catalunya es d'uns 90,8 casos nous anuals per a cada 100.000 homes i de 9,4 casos per a cada 100.000 dones. No existeix cap dubte en afirmar que l'inici de l'epidèmia del CP durant el transcurs del segle XX guarda relació al consum de cigarretes, confirmant l'estreta relació amb la malaltia. Ho demostren les dades que confirmen que el 85% dels CP són per causa del tabac. Malgrat els esforços realitzats per a la reducció del tabaquisme, el

cribratge i la detecció precoç, el CP es sol diagnosticar quan aquest ja es troba en un estadi avançat de la malaltia, la qual cosa augura un mal pronòstic. La taxa de supervivència global al 5 anys no és superior al 15% , taxa que s'ha duplicat en comparació amb els últims 30 anys. Tot i aquestes dades, estadístiques globals actuals estimen que un 15% del CP en homes i el 53% en dones no són atribuïbles al consum de tàbac, el que comporta el 25% dels casos de CP arreu del món.

4.3.2. Factors de risc:

4.3.2.1. Tabaquisme.

El fum del tabac conté més d'un miler de substàncies químiques, 60 estan identificades com a carcinògens per l'agència internacional per a la recerca en càncer (IARC). D'aquestes, més de 20 substàncies estan estretament lligades al desenvolupament del CP. Els més notables són els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP), com el benzo[a]pirè (BAP) i la nitrosamina específica del tabac, la 4-(methylnitrososamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone o NNK; comportant mutacions genètiques a través de formació d'adductes amb el DNA. Tot i que és àmpliament acceptat que el fum del tabac és la causa del CP, no tots els fumadors desenvolupen un CP. Els estudis epidemiològics han demostrat que els fumadors tenen 14 vegades més probabilitats de desenvolupar un CP que els no fumadors, però només un 11% dels fumadors empedreïts desenvolupen la malaltia. Properament s'espera que la malaltia en no fumadors s'incrementi respecte els fumadors, donades les activitats recents en prevenció del tabaquisme i programes de deshabituació. Actualment la importància del gènere, les implicacions

clinicopatològiques, i les diferències moleculars que sorgeixen entre fumadors i no fumadors afectats de CP ens pot portar a parlar de dos malalties diferents [45, 46].

4.3.2.2. Susceptibilitat genètica

Estudis epidemiològics demostren un risc 2,5 vegades superior de patir una neoplàsia pulmonar en una història familiar de CP. Un anàlisi de lligament a gran escala basat en 52 famílies ha identificat el principal locus autosòmic de susceptibilitat que heretat predisposa a patir un CP a 6q23-25. Per altra banda, tres estudis genètics independents han trobat un marcador en el cromosoma 15 associat al CP relacionat amb tres gens que codifiquen per subunitats del receptor nicotínic de l'acetilcolina donant lloc a proteïnes de la superfície de la cèl·lula en les quals les molècules de nicotina s'uneixen iniciant el canvi cel·lular [45-47]. El fet de que no tots els fumadors desenvolupin càncer de pulmó suggereix que hi han factors genètics que predisposen a certes persones a patir un CP. Les diferències en la capacitat de reparació del DNA també podrien contribuir a la susceptibilitat al càncer i per extensió a patir un CP a patir de la hipòtesi subjacent que els individus amb menor capacitat de reparació del DNA tenen un risc major de ser afectes d'un càncer per carcinògens. Per altra banda, el factor hormonal pren rellevància en comparar la gran proporció de CP en dones que mai han fumat amb homes que mai han fumat. Fet que suggereix un possible paper de les hormones dependents del gènere en el desenvolupament de la malaltia. Diversos estudis ja han proporcionat evidències que donen suport a la funció biològica dels estrògens en la

carcinogènesi pulmonar mitjançant la promoció directa de la proliferació cel·lular [45-47].

4.3.2.3. Ambient i exposició laboral.

Els efectes nocius del tabac es traslladen també als fumadors passius, als quals el risc de patir càncer s'incrementa fins a un 30% . Aquesta relació causal amb el CP pot explicar el 1,6% dels càncers de pulmó. Tanmateix, molts llocs de treball tenen els treballadors exposats a agents cancerígens. Els cristalls de sílice i les fibres d'amiant, l'exposició al gas redó de l'urani són carcinògens humans ben coneguts juntament amb l'exposició perllongada i acumulada a la contaminació de l'aire ambiental, causada per les emissions de compostos rics en diversos hidrocarburs aromàtics policíclics. La proporció dels CP atribuïbles a la contaminació de l'aire urbà a Europa s'estima en un 11% [45]. Pel que respecte a la dieta, el consum de alcohol i l'activitat física, s'han realitzat quantitat d'estudis on l'associació d'algun factor significativament vinculat a la protecció i/o disminució del risc no són més grans que es surtin dels paràmetres de les recomanacions per a una bona salut general.

4.3.3. Classificació histològica.

Les dos formes majoritàries de CP són el càncer de pulmó de cèl·lula petita o microcític (CPCP o CPM) i el càncer de pulmó de cèl·lula no petita o no microcític (CPCNP o CPNM) al qual fa referència aquest treball, i que aproximadament comporten el 85% dels tumors distribuïts en diverses histologies que el conformen.

4.3.3.1. Carcinoma de cèl·lula petita.

El CPCP és un tumor amb molta malignitat que sembla que es forma a partir de primitives cèl·lules neuroendocrines al pulmó i representa fins a un 15% de tots els càncers diagnosticats actualment. El CPCP solen sorgir en les vies aèries centrals amb infiltració de la submucosa i poc a poc obstrueixen la llum bronquial per difusió extrínseca o endobronquial. La presentació més comuna és la d'una massa hilar gran amb adenopatia mediastinal voluminosa. Les possibles conseqüències clíniques inclouen tos, dispnea, pèrdua de pes i debilitat amb o sense pneumònia postobstructiva. Aproximadament el 70% dels pacients es presenten amb malaltia metastàtica manifesta. El CPCP té una propensió especial a estendre's al fetge, glàndules suprarenals, os, medul·la òssia i el cervell. Tanmateix de vegades pot presentar-se amb una síndrome paraneoplàstica. Recentment, s'ha demostrat que repetides exposicions a la nicotina indueix moltes de les característiques malignes de les cèl·lules de CPCP, incloent un increment de la capacitat migratòria, d'invasió i de resistència a la quimioteràpia. Inicialment, els pacients amb CPCP responen bé a la quimioteràpia, però no obstant això, les recaigudes són inevitables ja que els pacients es tornen resistents al tractament citotòxic. Malgrat el tractament, la supervivència relativa als 5 anys és només del 6,4% , fent del CPCP el subtipus de CP més agressiu. Actualment no existeixen eines eficaces per a la detecció precoç del CPCP ja que es sol diagnosticar a causa dels símptomes associats a la disseminació de la malaltia com ara l'aparició de tumors malignes voluminosos intratoràccics o metàstasis a distància [48].

4.3.3.2. Carcinoma de cèl·lula no petita.

El CPCNP agrupa tres patrons histològics molt ben diferenciats, el carcinoma de cèl·lules escamoses (SCC), l'adenocarcinoma (ADC) i el carcinoma indiferenciat de cèl·lules grans (CCG).

4.3.3.2.1. Carcinoma de cèl·lules escamoses.

El SCC suposa el 30% dels casos de CPCNP. Sol presentar-se a la perifèria pulmonar com a un petit nòdul subpleural. En els estadis inicials envolta a les cèl·lules mucoses, sense invasió de la membrana basal podent tenir el pronòstic similar al de un adenocarcinoma perifèric. En estadis més avançats, aquest comença a envair el parènquima i el lumen bronquial, produint obstrucció amb la conseqüent atelectàsia i pneumònia. Histològicament es compon de cèl·lules amb un elevat grau de queratinització i solen tenir un creixement cel·lular lent.

4.3.3.2.2. Adenocarcinoma pulmonar.

El ADC comprèn el 40% del casos de CPCNP, correspon a la majoria de casos de afectats amb CP amb història de no fumadors. Representa un grup heterogeni de tumors. Els principals subtipus identificats per l'organització Mundial de la Salut (OMS) consten del carcinoma bronquioalveolar (BAC) acinar, papil·lar o sòlid amb mucines. No obstant això, la majoria dels tumors es componen de mescleres de dos o més subtipus. Aquest es sol localitzar a la perifèria i en les vies aèries petites. Actualment es reconeix com a precursor de la patologia, la hiperplàsia atípica alveolar (AAH), que són

lesions d'aproximadament 5mm de diàmetre que es componen de pneumòcits tipus II que proliferen a la paret alveolar, la qual pot presentar-se amb aparença normal o amb un major creixement de fibres . Aquests resultats indiquen un model de progressió d'etapes per a la majoria de adenocarcinomes perifèrics, AAHs que donen lloc a BACs no invasius que en etapes posteriors ho seran[49].

4.3.3.2.3. Carcinoma indiferenciat de cèl·lules grans.

El CCG correspon al 10% dels casos de CPCP. Es defineix com un carcinoma compost de cèl·lules tumorals grans on no s'hi troba cap cèl·lula diferenciada cap a una cèl·lula d'ADC o SCC. Poden comportar un component neuroendocrí observable per immunohistoquímica. Els nuclis d'aquestes cèl·lules grans sol estar al voltant dels 26µm de 2 a 3µm més que en el cas dels ADC i SCC i fins a 10µm que en el cas del CPCP.

Malgrat els avenços en la detecció precoç i el tractament, el CP es sol diagnosticar quan ja presenta un estadi avançat de la malaltia, la qual cosa implica un mal pronòstic. El diagnòstic i una acurada estadificació del CP són essencials per a la correcta elecció del tractament curatiu o pal·liatiu que afectarà al pronòstic del pacient. S'utilitzen procediments tant invasius com no invasius per quest propòsit. La Tomografia Computeritzada de tòrax (TC) i la Tomografia per Emissió de Positrons (PET) són tècniques no invasives per detectar l'afectació ganglionar i que guien en la presa de mostres histològiques de ganglis limfàtics, però sovint aquestes tècniques no són suficients i cal emprar tècniques més invasives com l'aspiració per agulla transbronquial (TBNA), l'aspiració amb agulla per ultrasò

endobronquial (EBUS) i la mediastinoscòpia, que s'utilitza per recol·lectar mostres histològiques de ganglis limfàtics. Atès que el pacients moltes vegades presenten males condicions generals o hipoxèmia greu a causa de malalties coexistents com l'emfisema, la MPOC, la insuficiència cardíaca, etc; pot esdevenir que no sigui possible l'ús de procediments invasius per al diagnòstic i l'estadificació per alguns pacient amb CP [45].

4.3.4. Estadificació.

Un cop feta la classificació histològica és necessari realitzar un avalució de l'extensió de la malaltia. L'estadificació es basava en les característiques clinicopatològiques alhora permetia establir grups de pacients que requerissin modalitats terapèutiques similars amb pronòstics semblants. Els sistemes dels estadis més utilitzats per al càncer de pulmó han estat el d'American Joint Committee on Cancer (AJCC 1979) i la Union Internationale contre Cancer (UICC). Totes dues utilitzaven un sistema basat en la TNM, proposat originalment per *Denoix* [50]. El sistema TNM està basat en la grandària de l'extensió del tumor primari (factor T), complicació dels nòduls limfàtics de la zona (factor N) i la presència o absència de metàstasis a distància (factor M).

L'última revisió del TNM del CP, la setena, sembla ser un millor predictor de recurrència local o regional del càncer de pulmó després de la cirurgia. El fet de poder definir millor quins pacients poden experimentar una recurrència del càncer és important, especialment tenint en compte les controvèrsies que envolten l'ús de teràpies adjuvants i la radioteràpia postoperatòria (RT) en pacients amb CPCNP. El passat 2009, l'Associació Internacional per a l'Estudi del Càncer de Pulmó (IASLC) va publicar la seva 7a edició de la classificació TNM, que es va desenvolupar en col·laboració

amb el Comitè Conjunt Americà del Càncer (AJCC) i la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC). Els canvis es van basar en una anàlisi d'una base de dades internacional a gran escala [51].

4.3.4.1. Descriptors TNM - Sistema internacional d'estadificació TNM -estadis 2009 (7^a edició).

4.3.4.1.1. T (Tumor primari) [52].

- TX. El tumor primari no pot ser avaluat, o tumor provat per l'existència de cèl·lules tumorals malignes en esput o rentats bronquials però no visualitzat per mètodes d'imatge o broncoscòpia.

- T0. No evidència de tumor primari.

- Tis. Carcinoma in situ.

- T1. Tumor ≤ 3 cm en la seva major diàmetre, envoltat per pulmó o pleura visceral, sense evidència broncoscòpica d'invasió més proximal del bronqui lobar (És a dir· no hi ha invasió en el bronqui principal).

T1a Tumor ≤ 2 cm en la seva major diàmetre.

T1b Tumor > 2 cm però ≤ 3 cm en la seva major diàmetre.

- T2. Tumor > 3 cm però ≤ 7 cm en la seva major diàmetre o un tumor amb qualsevol de les següents característiques (Els tumors T2 amb aquestes característiques es classificaran com T2a si el seu diàmetre és ≤ 5 cm)· afecta el bronqui principal, distant 2 o més cm de la carina principal; envaeix la pleura visceral, associat amb atelèctasi o pneumonitis obstructiva que s'estén fins a la regió hilar però no afecta el pulmó sencer.

T2a Tumor > 3 cm però ≤ 5 cm en la seva major diàmetre.

T2b Tumor > 5 cm però ≤ 7 cm en la seva major diàmetre.

- T3. Tumor > 7 cm o de qualsevol grandària que envaeixi directament qualsevol de les següents estructures: paret toràcica (incloent-hi els tumors del solcs superior), diafragma, nervi frènic, pleura mediastínica, pericardi parietal, o un tumor a menys de 2 cm de la carina principal però sense envair-ho associat a atelèctasi o pneumonitis obstructiva del pulmó sencer o existència de nòdul (s) tumoral (s) separat (s) del tumor primari, en el seu mateix lòbul.
- T4. Tumor de qualsevol grandària que envaeix qualsevol de les següents estructures: mediastí, cor, grans vasos, tràquea, nervi recurrent laringi, esòfag, cos vertebral, carina, o existència de nòdul (s) tumoral (s) separat (s) del tumor primari, en un lòbul diferent del pulmó homolateral.

4.3.4.1.2.N (Ganglis limfàtics regionals)[53]

- NX. Els ganglis limfàtics regionals no poden ser avaluats.
- N0. No hi ha metàstasis ganglionars limfàtiques regionals.
- N1. Metàstasi en ganglis limfàtics peribronquials homolaterals i/o hilars homolaterals i intrapulmonars, incloent l'afectació per extensió directa.
- N2. Metàstasi en ganglis limfàtics mediastínic homolaterals i / o subcarinals.
- N3. Metàstasis ganglionars limfàtiques mediastíniques contralaterals, hilars contralaterals, escalènics homolaterals o contralaterals, o supraclaviculars.

4.3.4.1.3.M (Metàstasi a distància) [52, 53]

- MX. Les metàstasis a distància no poden ser avaluades.
- M0. No hi ha metàstasi a distància.
- M1. Hi ha metàstasi a distància.
- M1a. Existència de nòdul (s) tumoral (s) separat (s) del tumor primari, en un lòbul del pulmó contralateral; tumor amb nòduls pleurals o vessament pleural (o pericàrdic) maligne.
- M1b. Hi ha metàstasi a distància.

No s'han realitzat canvis en la classificació N (nòduls limfàtics regionals). No obstant això, recentment s'acaba de realitzar una cartografia internacional nova dels ganglis limfàtics que defineix els límits anatòmics de les estacions ganglionars.

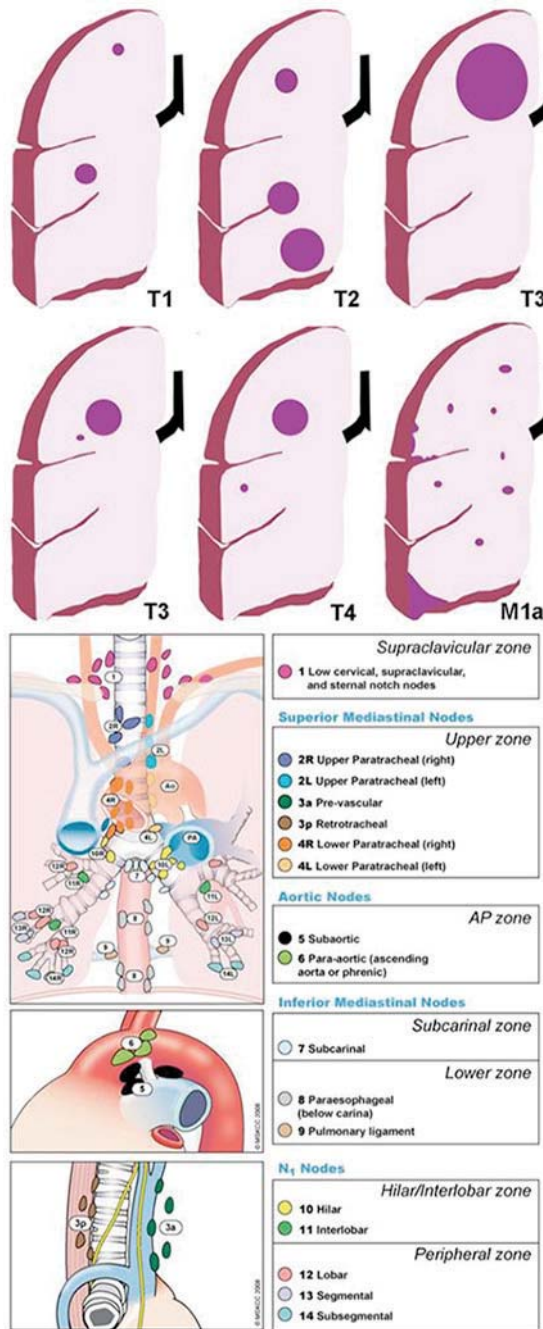


Figura 3. Descriptors de TNM. Representació gràfica dels descriptors TNM per la mida i localització tumoral en el pulmó i la localització de l'afectació ganglionar. Modificació de *Cano Alonso et al., 2012* conjuntament amb *Rusch et al., 2007*.

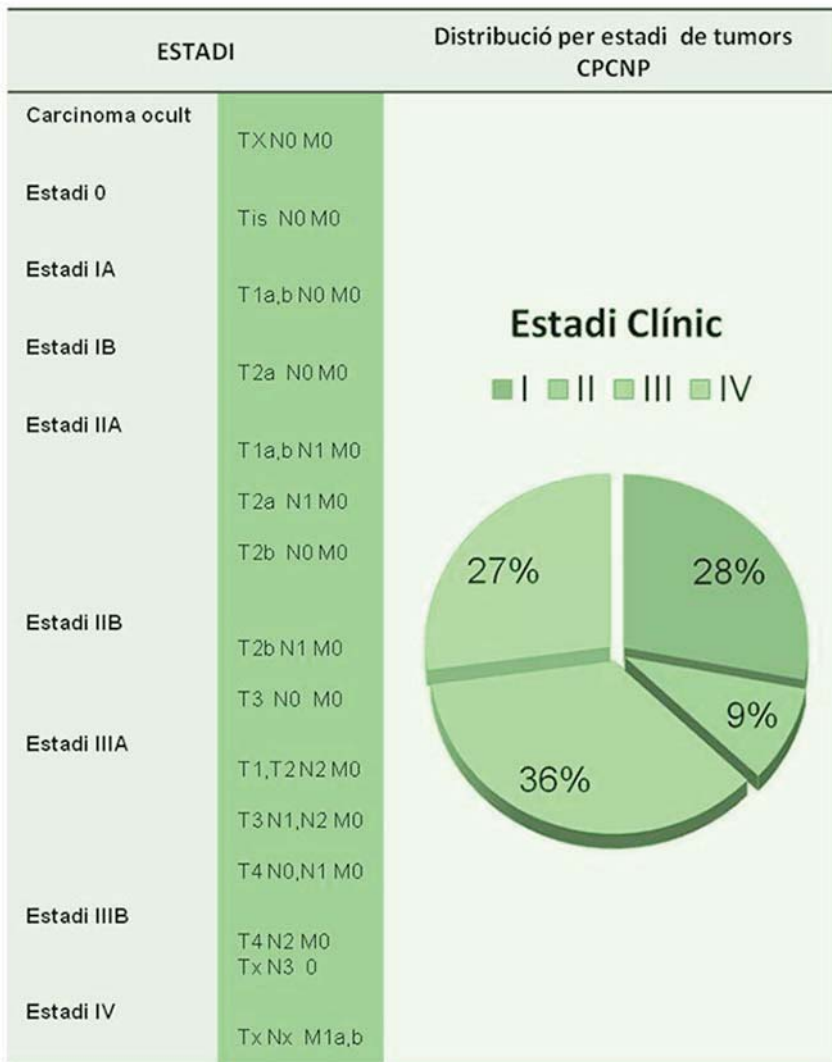


Figura 4.. Estadiatge segons TNM. Caracterització dels estadis segons el TNM clínic i distribució en tant per cent del nombre de pacients registrats en la base de dades de la IALC (*International Association for the Study of Lung Cancer*).

4.3.5. Tractaments.

4.3.5.1. Cirurgia.

La resecció quirúrgica continua essent l'única opció més consistent i eficaç per a la curació de pacients amb diagnòstic de CP. Per tal que la intervenció sigui exitosa i viable terapèuticament, l'extracció del tumor ha de cursar amb una escissió complerta i el pacient ha de ser capaç de tolerar la intervenció quirúrgica proposada. En la rescabilitat del tumor s'avalua l'estadificació preoperatòria on s'inclouen estudis d'imatge previs i biòpsies, alhora que s'avaluen els factors del pacient i mètodes operacionals que redueixin al mínim el risc quirúrgic i la morbiditat. L'estadificació mediastínica, és molt important pel fet que la informació pronòstica que proporciona és molt valuosa per determinar el tractament adequat, donat el grau d'afectació. El tractament quirúrgic adequat per a la cura potencial es basa en assolir la resecció complerta o resecció R0. El criteri estàndard actual per a la resecció pulmonar és la lobectomia per als tumors resecables en pacients capaços de tolerar la intervenció. Aquesta afirmació es suporta en un assaig aleatoritzat, controlat que mostrarà una major supervivència a llarg termini i la disminució de la recidiva local en pacients sotmesos a lobectomia en comparació amb aquells sotmesos a una resecció limitada (segmentectomia)[54-56].

4.3.5.2. Quimioteràpia.

Més del 70% de pacients amb CP es presenta amb la malalta localment avançada o metastàtica en el moment del diagnòstic i en aquest casos la quimioteràpia és beneficiosa per al tractament pal·liatiu. Tot i que la

quimioteràpia és adequada per a molts pacients amb CP, existeix un consens en que l'ús dels quimioterapèutics tradicionals, basats en agents platinats ha arribat al seu plateau. Aquests poden combinar-se amb drogues com taxans (paclitaxel, docetaxel), vinorelbina, anàlegs de la camptotecina (irinotecan, topotecan) i gemtacitabina. Juntament amb la combinació amb aquestes drogues s'obtenen taxes de supervivència de 30% a 40% superiors que l'ús com a monoteràpia que tanmateix estudis en fase III han demostrat que les combinacions de diferents agents platinats presenten taxes de resposta i supervivència semblants [54, 57-59]. El tractament adjuvant no forma part encara de la majoria de guies, però sembla tenir un paper assegurat en el postoperatori dels casos de CPCNP. Està indicada generalment per als pacients amb resecció quirúrgica en els estadis compresos de IIA - IIIA en CPCNP. on la quimioteràpia adjuvant basada en cisplatí un augment del 5% en la taxa de curació. És important saber que el règim més comunament usat, el cisplatí-vinorelbina, no és ben tolerat pels pacients, especialment després d'una pneumonectomia. Aquest fet va comportar l'administració del tractament complet a només el 50-75% dels pacients en els estudis de fase III [56, 60].

4.3.5.3. Radioteràpia.

Hi ha tres escenaris principals en què la radioteràpia participa en el tractament radical de la CPCNP: com a tractament exclusiu i alternativa a la quimioteràpia, com a teràpia adjuvant després de la resecció quirúrgica on la seva eficàcia és motiu de controvèrsia i en combinació amb la quimioteràpia, en els anomenats estadis localment avançats de la malaltia que és la més freqüent. Consisteix en la

seva administració combinada amb la quimioteràpia en els estadis de malaltia localment avançada (IIIA-IIIB); fet que suposa un 35 - 40% dels casos en el moment del diagnòstic. El tractament concomitant ofereix una millora en la supervivència respecte a la seva administració seqüencial, constituint la terapèutica estàndard en el CPCNP localment avançat encara que a costa d'un augment dels efectes secundaris[61, 62].

4.3.5.4. Estratègia terapèutica basada en l'estadiatge.

En el moment del diagnòstic dels pacients amb CPCNP, aquests es poden dividir en els següents tres grups que reflecteixen tant l'extensió de la malaltia com l'enfocament de tractament-

1.- La malaltia localitzada és quirúrgicament resecable en un 36% dels casos presentats (generalment estadi I, estadi II i alguns tumors de l'estadi III). Compta amb el millor pronòstic, el que depèn d'una varietat de factors relacionats amb el tumor i el pacient. Els pacients amb malaltia resecable que tenen contraindicacions mèdiques per a la cirurgia són aptes per radioteràpia curativa. La quimioteràpia combinada adjuvant amb base al cisplatí pot proveir un avantatge pel que fa a la supervivència dels pacients de CPCNP ressecat en estadi II o estadi IIIA.

2.- Malaltia avançada local (T3-T4) o regional (N2-N3). mostra una evolució clínica heterogènia i alguns malalts amb tumors localitzats amb la malaltia avançada poden beneficiar-se dels tractaments de modalitat combinada. Els pacients amb malaltia no resecable o N2-N3

es tracten amb radioteràpia en combinació amb quimioteràpia; altres malalts amb tumors T3 o N2 es poden tractar eficaçment amb resecció quirúrgica i quimioteràpia preoperatòria o postoperatòria o amb quimiorradiació.

3.- La malaltia amb metàstasi a distància (inclou metàstasi a distància (M1) descobertes en el moment del diagnòstic). Es pot tractar amb radioteràpia o quimioteràpia per alleujar els símptomes del tumor primari. Els pacients amb bon estat general, les dones i els pacients amb metàstasi confinades a distància en un sol lloc viuen més. La quimioteràpia basada en compostos platinats s'han relacionat amb l'alleujament a curt termini dels símptomes i amb un avantatge en la supervivència. En l'actualitat, no hi ha cap règim de quimioteràpia sola que es pugui recomanar per a ús rutinari. Els pacients prèviament tractats amb quimioteràpia combinada amb platí poden obtenir un control dels símptomes i un benefici per a la supervivència amb docetaxel, pemetrexed o un inhibidor del receptor del factor de creixement epidèrmic [63, 64].

Modalitats de tractament

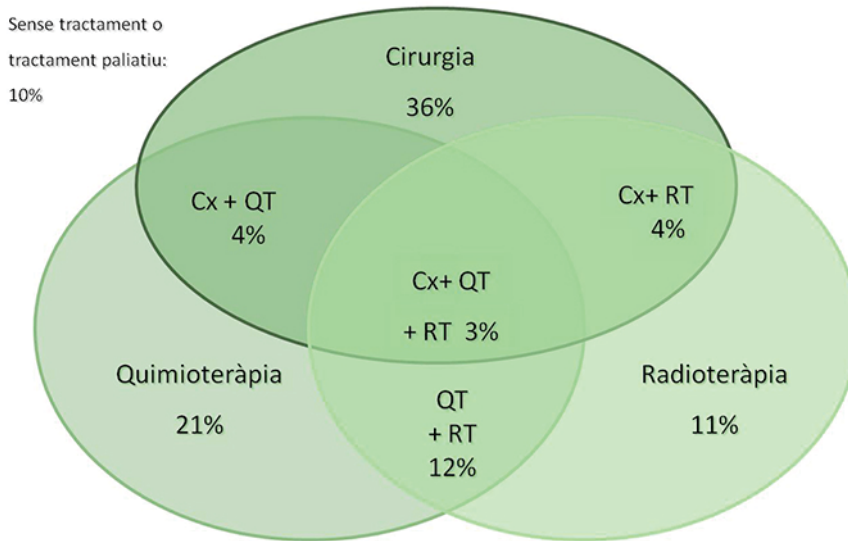


Figura 5. Modalitats de tractament per al CP. Representació de tractament aplicat en 81.495 casos de CP segons Goldstraw i Crowley, 2006.

4.3.6. Alteracions moleculars en CP.

Diversos factors contribueixen a la formació del CP, i malgrat tot, a dia d'avui, alguns dels mecanismes implicats en la carcinogènesi pulmonar continuen sent encara uns desconeguts. Els estudis sobre el CP mostren la gran varietat d'alteracions genètiques i epigenètiques que presenten aquests tipus de tumors i on s'ha demostrat que les cèl·lules preneoplàsiques i l'epiteli bronquial normal presenten algunes d'aquestes alteracions, constatant que el CP es desenvolupa a partir de cèl·lules normals de l'epiteli per diversos processos amb diferents fases que impliquen canvis genètics i epigenètics successius.

4.3.6.1. L'adenocarcinoma pulmonar: lesions preneoplàsiques, bases moleculars i alteracions epigenètiques.

Com s'ha indicat anteriorment, diversos estudis han demostrat diferents patrons d'alteracions per als dos majors tipus de CPNPC com s'ha fet palesa en l'anàlisi de pèrdues al·lèliques i de l'estat de metilació per a múltiples gens en relació a les diferències moleculars. En una línia semblant, un gran nombre d'estudis s'estan duent a terme per tal d'identificar patrons específics d'expressió gènica i nous marcadors moleculars per als diferents tipus histològics de CP, com és l'objectiu final d'aquesta tesi per a l'ADC. Recentment, s'han identificat diferències en la freqüència de metilació en els gens supressors de tumors p16INK4a, *APC* i *CDH13* entre ADC i SCC, suggerint que els dos majors tipus histològics de CPCNP presentin uns patrons característics de metilació diferents. Actualment està ben establert que en ADC la presència de mutació en els gens *KRAS*, *EGFR* i *Her2/neu* és característica exclusiva d'aquesta histologia en CP. La presència d'alguna de les mutacions d'*EGFR* o *KRAS* en ADC són excoelents entre elles, indicant dos rutes moleculars diferents per a la progressió de l'ADC.

4.3.6.2. La lesió premaligne i preinvasiva.

Actualment s'estableix que l'origen del CP és degut a una sèrie de canvis patològics progressius, anomenats lesions preneoplàsiques o precursors en la mucosa respiratòria. Es consideren bàsicament dues lesions preneoplàsiques, la hiperplàsia alveolar atípica (AAH) i el carcinoma brocoalveolar (BAC) diferenciades com a lesió premaligne i

invasiva; i lesió preinvasiva i intermedia respectivament precursora de l'ADC incloses en l'actual classificació histològica per a les lesions preinvasives de l'organització Mundial de la Salut (OMS)[49, 65].

L'AAH és una lesió parenquimatosa que sorgeix en els alvèols prop dels bronquïols terminals i respiratoris que poden comportar úniques o múltiples lesions, on la cel·lularitat i la citologia atípica varien segons el grau de la lesió. Diferents estudis suporten el postulat que la progressió de l'AAH es fa per mitjà del creixement de cèl·lules neoplàsiques a través de les estructures preexistents alveolars sense l'evidència d'invasió estromal, pleural o vascular i sense metastasi. L'AAH està freqüentment detectada en pacients de CP (9% - 20%), especialment en ADC (40%) en comparació amb el SCC (11%).

Es considera que un BAC és superior a 10 mm de diàmetre amb un elevat pleomorfisme, una baixa estratificació amb cèl·lules compactades i una transició abrupta amb les cèl·lules alveolars adjacents. En molts casos es fa difícil distingir entre una molt atípica AAH i un BAC. Alguns pacients presenten un gran nombre de lesions d'AAH (>40) en conjunció amb múltiples ADCs i BACs sincrònics perifèrics. No obstant això, és molt difícil saber quines lesions d'AAH progressaran cap ADC i quines lesions poden revertir. Tanmateix, malgrat acceptar que els ADC deriven de AAH en les cèl·lules aèries perifèriques encara són incertes les estructures i els tipus de cèl·lules epitelials involucrades. Pel que fa a les alteracions moleculars més comunes relacionades amb el gens de les principals vies de control cel·lular que recolzen l'evidència que és una lesió preneoplàsica són la presència de la mutació de KRAS (codó 12), present al 39% de les AAH; la sobreexpressió de la Ciclina D1 (70%), de p53 (10 - 58%), survivina

(48%), HER/neu (7%). També són susceptibles de presentar LOH en cromosomes freqüentment relacionats amb la presència d'ADC com són els afectes 3p (18%), 9p (p16INK4a, 13%), 9q (53%), 17q i 17p (TP53, 6%), relacionat amb subtipus d'ADCs que presenten moltes AAHs sincrònicament. Tanmateix segons el grau d'atípia de la lesió es detecta l'activació de la telomerasa reportat entre el 27% i el 78% de les AAH. En estudis recents s'ha observat que la pèrdua del gens supressors de tumor, LKB1, és freqüent en ADC (25%) i en AAH amb molta atípia citològica (5%), observant-se rarament en AAH amb baix grau d'atípia i suggerint que la inactivació de LKB1 pot estar implicada en la progressió de les AAHs [46, 49, 59, 65].

4.3.6.3. L'epiteli bronquial com a precursor de l'ADC.

Malgrat l'assumpció ja exposada que les AAHs són les precursoras precursors per als ADC perifèrics, l'origen de molts ADCs especialment els centrals és desconegut. S'especula que lesions no AAHs podrien ser-ne l'origen al demostrar-se la presència de mutacions de KRAS en epiteli bronquiolar atípic juntament amb alteracions dels gens per mutacions com BRAF, HER2/neu i especialment EGFR. Diferents estudis evidencien que la majoria (90%) de les mutacions d'EGFR en ADC succeeixen sense afectar la pauta de lectura en l'exó 19 i conjuntament amb una mutació sense sentit en l'exó 21 (L858R), amb especial incidència en la població asiàtica de gènere femení. Estudis recents han evidenciat que aquestes mutacions es desenvolupen en les etapes inicials dels CP al trobar-se en epitelis bronquiolars i bronquials (43%) en aparença no tumoral i aquest podent ser adjacents a ADC mutats per EGFR; constatant-se al no

trobar-se en pacients sense la presència de la mutació al tumor. Diversos estudis reporten una major presència d'EGFR mutat en epitelis d'aparença normal dintre del tumor (43%) que en epitelis adjacents (24%) suggerint un efecte local d'aquesta alteració. Tanmateix s'ha trobat una major freqüència de la mutació en cèl·lules procedents de petits bronquis en comparació amb cèl·lules bronquiolars fet que pot correlacionar-se amb l'origen cel·lular de l'ADC donada la divergent població cel·lular dels epitelis que els conformen. Els investigadors afirmen que les alteracions genètiques d'EGFR no juguen un paper rellevant en la patogènesi de la neoplàsia alveolar, arrel de ser relativament infreqüent la mutació en AAH i no trobar-se pràcticament en BACs.

Recentment s'ha evidenciat una baixa freqüència d'anormalitats moleculars detectades en l'epiteli respiratori situat al centre bronquial en pacients amb ADCs perifèrics en comparació amb mostres de pacients amb SCC i CPCP, suggerint als investigadors la presència de dos compartiments en el pulmó amb diferents respostes al dany genètic relacionat amb el grau de tabaquisme. Per tant, es pot afirmar que els fumadors que desenvolupen SCC o CPCP presenten unes alteracions genètiques més relacionades amb el tabaquisme en l'epiteli respiratori de la via aèria central, mentre que els pacients que desenvolupen ADC tenen danys principalment a les vies respiratòries perifèriques (petits bronquis, bronquíols i alvèols) [46, 49, 59, 65].

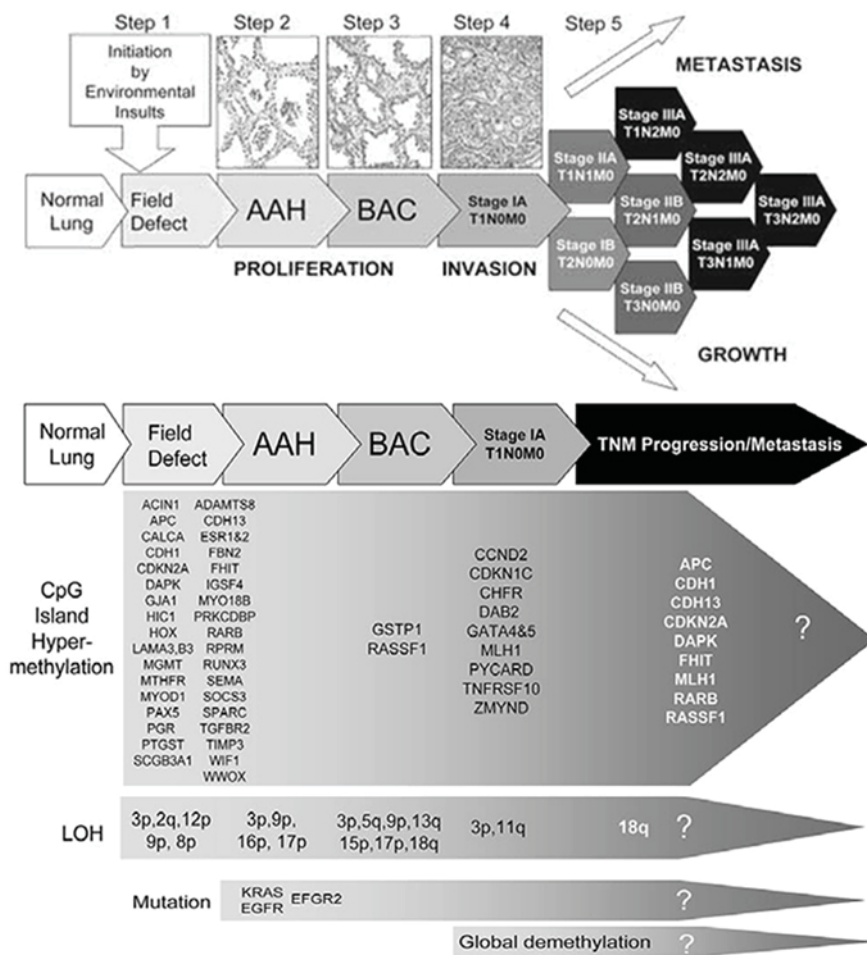


Figura 6. Canvis epigenètics en l'evolució i progressió de l'ADC. Modificat de Kerr et al., 2007.

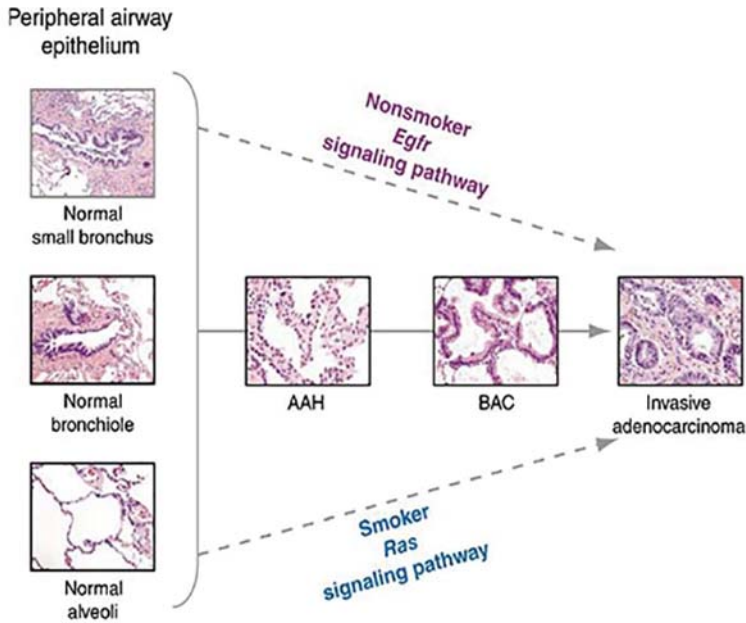


Figura 7. Rutes moleculars principals en la progressió de l'ADC. Les dues rutes moleculars principals postulades com a tret diferencial entre els pacients amb hàbits tabàquics diferents en la progressió de l'ADC. *Wistuba i Gazdar, 2005.*

4.3.7. El paper dels miRNAs en el desenvolupament del CP.

El perfil molecular d'expressió de miRNAs és únic en CP en comparació amb les cèl·lules epitelials normals i presenta per a cada histologia una signatura característica. Es poden correlacionar el perfils d'expressió per miRNAs amb la supervivència en ADC, inclús en l'estadi I, fet que indica que els perfils d'expressió de miRNAs són marcadors de diagnòstic i pronòstic en el CP [66]. La família de miRNAs let-7 inhibeixen l'expressió de proteïnes Ras, que estan mutades i sobreactivades en molts ADC relacionats amb el tabaquisme. Let-7 mostra una disminució de l'expressió en CP en comparació amb el teixit circumdant no tumoral del pulmó. Dues

espècies de Let-7 (Let-7a-1 i Let-7f-1) defineixen dos grups d'expressió amb nivells d'expressió baixos que es correlacionen amb una menor supervivència. Diferents *microarrays* d'expressió han demostrat que en la regulació de la proliferació Let-7 regula l'expressió de gens responsables del control del cicle cel·lular, com la Ciclina E, E2F1, SKP2 i MCM; la divisió cel·lular mitjançant la regulació de les Auroras A i B, alhora que també regula la resposta dels gens reparadors del DNA com BRCA1 i 2, RRM1 i 2, CHK1 i HMGA2. Com les mutacions en RAS que rares vegades es troben en els tumors de no fumadors, l'expressió de la família de let-7 es preveu que mostrin diferències entre els tumors de fumadors i de no fumadors. El miR-17-92 contingut en l'amplificació en 13q31, està sobreexpressat en el CP típicament en CSCP, actua en la via oncogènica de Myc i E2F1 [40, 67, 68]. El miR-34 reproduceix gairebé totes les funcions de p53, completant així el trencaclosques de la xarxa de p53. Aquest miRNA recapitula les principals activitats de p53 cap a l'arrest del cicle cel·lular i la promoció de l'apoptosi. En diferents càncers humans s'han reportat delecions de miRNAs de la família de miR-34, ja que miR-34 es troba en una regió de freqüent deleción heterozigota en el cromosoma 1p36, com s'ha identificat en diferents línies cel·lulars de CP amb petites delecions i disminucions en l'expressió de miR-34. En estudis recents sobre la implicació de diversos miRNAs en les vies no oncogèniques i de supressió de tumors comencen a mostrar-se com l'explicació de moltes de les interaccions entre les diverses vies. En el cas del CP els enzims de maduració dels miRNAs, com és el DICER, són necessaris per a les ramificacions bronquials en el desenvolupament pulmonar. L'expressió d'aquest disminueix en lesions preinvasives d'AAH en els transkurs cap a ADC via BAC. El nivell de DICER es presenta com un factor predictiu de supervivència presentant un

temps de supervivència més curt en ADCs amb un nivell baix de DICER [67, 69, 70].

4.3.8. Alteracions epigenètiques en CP.

En el CP s'ha estudiat la metilació del promotor de múltiples gens en línies cel·lulars, tumors i mostres no invasives (sèrum, esput, plasma i rentades broncoalveolars). El llistat de gens en què s'ha descrit la presència d'hipermetilació aberrant del promotor en mostres de CP és extens: p14-ARF, *APC*, Bcl2, BRCA1, *CDH1*, *CDH13*, p16-CDKN2A, DAPK, EGFR, FHIT, GSTP1, IGF -BP3, MGMT, MLH1, RARB, *RASSF1A*, RB1, SRBC, TGFbR2, TIMP3, TSLC1, etc. Encara que tan sols alguns es troben metilats en > 30% dels tumors: *APC*, p16, *CDH13*, DAPK, *TMS1/ASC*, RAR β i *RASSF1A*. Atès que la metilació d'un sol gen és relativament baixa, s'ha plantejat que l'estudi simultani d'un panell de gens pot tenir un major potencial. Hi ha diverses publicacions en què s'analitzen entre 5 i 30 gens en mostres de pulmó i teixit pulmonar no tumoral del mateix pacient, i en tots els estudis descriuen una major freqüència de metilació en el teixit tumoral que en el no tumoral.

Un recent estudi ha demostrat que els promotors de diferents gens mostren hipermetilació del DNA en les diferents etapes de la seqüència putativa del desenvolupament de l'ADC i alhora que incrementen els nivells de metilació a mesura que progressa, recolzant el model de lesions premalignes d'AAH i BAC com a precursors d'un subconjunt d'ADC. Aquest model de transició d'hiperplàsia, carcinoma in situ i finalment càncer invasiu provocat per diverses alteracions epigenètiques, és similar al presentat en càncer de colon i mama. En aquest mateix estudi s'observa una significativa hipometilació en ADC en comparació amb les mostres d'AAH

i BAC, suggerint que la hipometilació global dominant succeeix posteriorment a la hipermetilació. Un estudi recent de la hipometilació global en CP en estadi I descriu una relació significativa entre els estadis IB i IA, podent associar-se amb aquest últims tumors de major grandària i morfologia menys diferenciada, tot indicant que possiblement es tracti d'un esdeveniment més aviat tardà [65].

Destacar que en contrast amb la mutació del gens, la hipermetilació del promotor és un procés reversible, de manera que és una destinació molt atractiva per a la teràpia del càncer [71]. De fet, un inhibidor de la metilació del DNA, l'azacitidina (Vidaza), prolonga la supervivència en pacients amb síndrome mielodisplàsic, però la seva eficàcia per al tractament del CP no es coneix.

4.4. TÈCNiques D'ANÀLISI DE LA METILACIÓ.

4.4.1. Illes CpG.

Les illes CpG són regions curtes de DNA, de centenars a pocs milers de parells de bases, en les quals la freqüència de CpGs és més elevada, estant associades a les regions promotores del 76% dels gens del genoma humà, tant *house-keeping* com d'expressió dependent de teixit [10]. Els criteris per tal d'establir que una seqüència genòmica sigui considerada illa CpG, ha de complir els següents tres criteris:

1. La seva longitud ha de ser igual o superior a 500pb
2. El seu contingut de G + C ha de ser igual o superior a 0.55
3. El quocient entre el nombre de dinucleòtids CpG observats i els esperats ha de ser igual o superior a 0.6

metilats. Per altra banda l'especificitat tant diagnòstica com analítica es corresponen amb el nombre de mostres testades negatives que es corresponen amb mostres no tumorals [72].

Coexisteixen diferents mètodes basats en aquesta aproximació. Cadascun presenta avantatges i desavantatges pel que fa al seu ús en la pràctica clínica per la gran promesa com a biomarcadors per a la detecció precoç i prognòs que representen l'alteració dels patrons de metilació de nombrosos gens. Aquestes metodologies per PCR basades en la transformació amb bisulfit es poden classificar en dos estratègies segons el disseny de *primers* si són específics i condicionats per l'estat de metilació del DNA o per altra banda permeten una amplificació equivalent dels dos tipus d'al·lels independent de l'estat de metilació del DNA.

4.4.2.1. Tractament de bisulfit sòdic base dels estudis de PCR.

La necessitat del tractament amb bisulfit sòdic ve donada per la incapacitat de la DNA polimerasa durant la PCR de diferenciar entre una Citosina i una 5mC. Per tant després de la realització d'una PCR es perd qualsevol metilació d'origen que estigués present en els al·lels. El tractament del DNA amb bisulfit sòdic preservem la informació de l'estat de metilació del DNA per anàlisis posteriors per PCR. El tractament amb bisulfit sòdic transforma una Citosina en un Uracil per mitjà d'una desaminació. Donat que la taxa de desaminació d'una 5mC a una Timina (que seria la base resultant) és molt més lenta que el pas de Citosina a Uracil s'assumeix que les Citosines que romanen posteriorment al tractament provenen de 5mCs. D'aquesta manera en posteriors amplificacions per PCR els residus d'Uracils es replicaran com a Timines i els residus provinents de les 5mC com a Citosines [73].

Quan el tractament de bisulfit de sodi es realitza en les condicions adequades la taxa de conversió de les Citosines no metilades es situa al voltant del 99%. Malgrat aquesta alta taxa de conversió, però, és possible que un petit subconjunt de les còpies de DNA pateixin una taxa de canvi substancialment més reduïda alhora que s'ha observat que aquesta taxa de no conversió sembla no ser aleatòria, de manera que algunes regions promotores són més propenses a la conversió incompleta. Existeixen estudis que demostren que la transformació pot dependre de la regió analitzada o de la qualitat del DNA, condició important a considerar alhora de realitzar la cerca de baixos nivells de metilació amb mètodes basats en *primers* MSP [74].

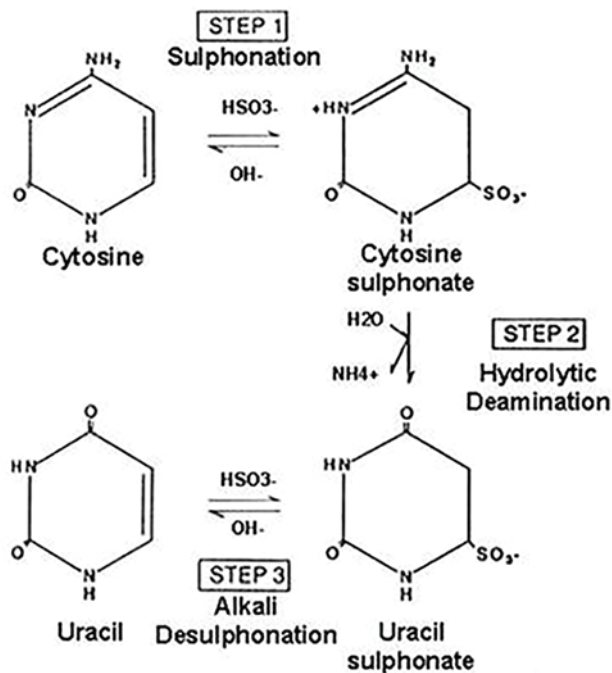


Figura 8. Conversió amb bisulfit sòdic. Canvis moleculars produïts durant la transformació de citosines a uracils durant el tractament amb bisulfit. *Clark et al., 1994.*

4.4.2.2. Tècniques basades en el disseny de *primers* amb criteri MSP.

Els mètodes que inicialment ofereixen una major sensibilitat analítica són els basats amb *primers* per a PCR específiques de metilació (MSP). Aquests ofereixen una amplificació específica de l'al·lel metilat per tal el biaix produït per la PCR no és un problema en aquesta aproximació. Els primers inclouen en la seqüència diversos dinucleòtids CpG preferentment pròxims a l'extrem 3' de la seqüència. D'aquesta manera controlant les condicions de forma astringent idealment l'amplificació es limita a la condició metilada del DNA. Tanmateix aquesta aproximació està associada amb una elevada taxa de falsos positius condicionada per la unió erràtica dels *primers* però sobretot per una conversió incompleta per part del bisulfit sòdic deixant un romanent de Citosines no transformades. Alhora l'elevat nombre de cicles de PCR necessaris per obtenir l'elevada sensibilitat analítica implica una exaltació d'aquest error. Aquest error es pot detectar per mitjà de la inclusió en l'assaig de controls negatius de metilació. Existeixen diferents alternatives per tal de disminuir l'error per unió errònia dels *primers* com per exemple incrementar la temperatura d'*annealing* i/o limitar el nombre de cicles possibles. El problema dels falsos positius és que aquests poden mimetitzar les seqüències metilades ja que aquests compten amb múltiples Citosines en la seqüència que formen part de dinucleòtids CpG i s'analitzaran com a 5mC. La mateixa característica de disseny dels *primers* que ofereix una elevada selectivitat per altra banda afavoreix l'amplificació de seqüències incompletament convertides pel tractament amb bisulfit sòdic. El fet de incloure un

nombre substancial de Citosines no corresponents a dinucleòtids CpG ajuda a limitar aquest error.

4.4.2.2.1. PCR específica de metilació (MSP).

És la tècnica de referència en aquesta aproximació. A més del disseny de *primers* MSP s'utilitzen un parell de *primers* addicionals per detectar el DNA no metilat i alhora poder confirmar l'efectivitat de conversió del bisulfit sòdic. Els resultats obtinguts es resolen en un gel d'agarosa i permet estimar la proporció de DNA metilat i no metilat existent en la mostra analitzada. Per la seva senzillesa i la seva relació cost-efectivitat el MSP és la tècnica més emprada per analitzar l'estat de metilació de locis específics [75].

4.4.2.2.2. MSP quantitatives, Metylight.

Va ser la primera aproximació per MSP quantitativa utilitzant sondes fluorescents. El senyal de fluorescència és creat per la ruptura d'una sonda d'hidròlisi dissenyat per hibridar específicament entre el *primers* fet que limita qualsevol senyal d'amplificació inespecífica com la formació de dímers de *primers*. D'aquesta manera no és necessària resoldre l'anàlisi en un gel d'agarosa. La fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de molècules amplificades [76].

4.4.2.2.3. Basades en SYBR-Green o SMART-MSP.

Les dues metodologies es fonamenten en l'ús d'agents intercalants per a la doble cadena de DNA. Aquest colorants no inhibeixen la

PCR quan s'intercalen en el DNA amb elevats nivells de saturació, fent possible la quantificació d'alta precisió i anàlisi de l'amplificació per corbes de *melting* al final de la PCR de manera que a mesura que augmenta la temperatura durant l'etapa l'agent intercalant fluorescent s'allibera i el senyal de fluorescència disminueix ràpidament. Els canvis que es produeixen en la fluorescència és específica de la seqüència i poden ser monitorats permetent discriminar els artefactes produïts durant l'amplificació de la PCR com la dimerització dels *primer* fent que no sigui necessari realitzar una electroforesi del producte amplificat [77, 78].

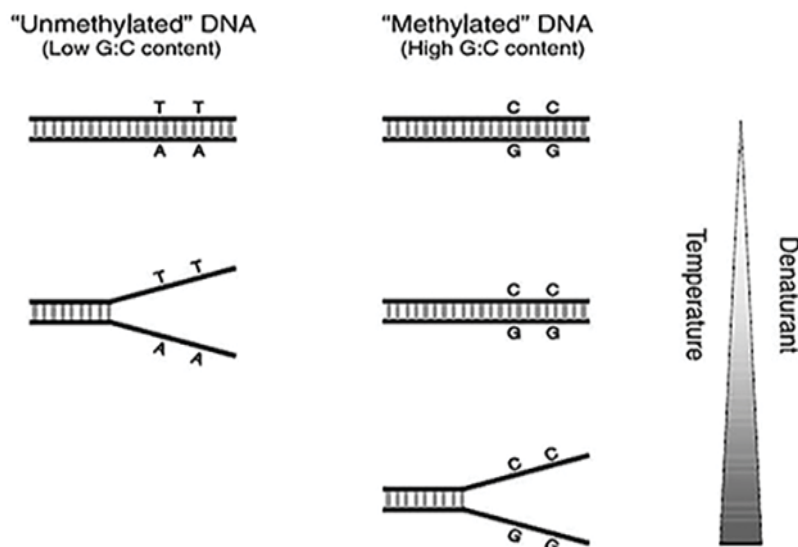


Figura 9. Anàlisi per corba de *melting*. Separació de la doble cadena de DNA amb la conseqüent alliberació de l'agent fluorescent intercalant segons la temperatura en relació a la riquesa del contingut en (C+G) del fragment analitzat. *Guldberg et al., 2002.*

4.4.2.2.4. MS-FLAG.

El senyal de fluorescència és creat per la divisió dels *primers* MSP per una endonucleasa termostable, la PspGI. Els *primers* contenen un oligonucleòtid on a l'entrem 5' té una cua que amb una sonda fluorescent i el seu bloquejador separats pel lloc de reconeixement de l'endonucleasa. El lloc de reconeixement de doble cadena, no es crea fins que els *primers* han hibridat i la polimerasa ha creat una nova còpia de la seqüència diana. La precisió de la metodologia es pot veure compromesa per la formació de dímers de *primers* i ha de ser evitada a través d'un disseny òptim d'aquests. Per tant, l'anàlisi postPCR es requereix per confirmar que l'amplificació ha estat específica comportat una visualització per electroforesi [79].

4.4.2.3. Tècniques basades en el disseny de *primers* amb criteri MIP.

L'ús de *primers* per a realitzar PCR independents de l'estat de metilació (MIP) permeten en una condició ideal, amplificar una amplificació proporcional del DNA metilat com del no metilat. Malgrat el disseny amb capacitat per hibridar amb les dos condicions del DNA existeix una important biaix cap a les seqüències no metilades del DNA, que es poden explicar per les diferències del contingut en G+C entre l'estat metilat i no metilat del DNA. Diferents alternatives s'han proposat per tal de corregir el biaix manipulant la temperatura de *annealing* o com proposen *Wodjack et al.* [80] incloent en la seqüència dels *primers* algun residu CpG i controlant la temperatura d'*annealing*, perdent certa condició inicial de MIP. Les aproximacions realitzades per mitjà de MIP es solen considerar limitades per la seva relativa poca

sensibilitat analítica tot hi que al afegir residus CpG, comentat anteriorment, incrementa substancialment la seva sensibilitat.

4.4.2.3.1. Seqüenciació genòmica per bisulfit.

Tradicionalment la seqüenciació del DNA modificat per bisulfit sòdic i posteriorment amplificat per PCR ha estat el “*gold standard*”. Aquesta aproximació metodològica aporta informació individual del cadascuna de les CpG que conformen la seqüència de DNA a analitzar. Els productes de PCR es poden seqüenciar directament o per mitjà de clons individuals. Al seqüenciar els productes de PCR a partir de clonatge individual, aquest proporciona informació sobre les molècules individuals; mentre que la seqüenciació directa proporciona una estimació de l'estat de metilació mitjana de cada lloc CpG. Per al a la seqüenciació s'utilitzen principalment *primers* MIP, però també s'han utilitzat *primers* MSP per tal de confirmar els resultats. Quan s'utilitzen *primers* MSP totes les molècules amplificades s'espera que estiguin metilades, de manera que per establir la proporció de molècules metilades i no metilades d'una mostra s'utilitzen *primers* MIP. Actualment la seqüenciació de clons individuals és massa llarga i costosa per ser utilitzada de forma rutinària en entorns clínics [81].

4.4.2.3.2. Piroseqüència.

La tècnica es basa en la detecció del pirofosfat per mitjà de a detecció de la llum emesa durant la síntesi de la cadena

complementària per una DNA polimerasa amb deficiència de l'activitat exonucleasa. Quan s'incorporen els nucleòtids, el pirofosfat s'allibera i es converteix en ATP per l'enzim ATP sulfurilasa. Aquestes molècules d'ATP proporcionen l'energia a l'enzim luciferasa per oxidar luciferina en una reacció que genera llum. Els quatre nucleòtids diferents s'afegeixen seqüencialment permeten identificar quina és la base incorporada en cada moment [82]. La piroseqüenciació es pot utilitzar per a moltes aplicacions però l'exactitud quantitativa i la fiabilitat de les dades disminueix a mesura que existeix una major distància de la CpG d'interès respecte l'extrem 3' del primer. Una característica que limita el nombre de bases i llocs CpG que es poden analitzar en una única reacció de seqüenciació [83]. Alhora llargues regions de Timines habituals en el DNA convertit per bisulfit també és probable que afecti la reproductibilitat. Malgrat que la piroseqüència es du a terme habitualment amb partir de productes derivats de MIPs, però també es pot utilitzar per identificar els resultats falsos positius en assaigs d'MSP [84].

4.4.2.3.3. Combinació de bisulfit amb anàlisis de restricció (COBRA).

Aquesta estratègia consisteix en el tall del producte amplificat amb enzims de restricció que continguin CpG en la seva seqüència diana. Si el producte de PCR prové d'una seqüència lliure de metilació, la citosina es converteix en timina i la diana es perd, de manera que l'enzim no talla. En canvi si la citosina en la diana estava metilada, la citosina no es converteix i la diana es conserva,

permetent el tall amb l'enzim de restricció. Posteriorment es visualitzen els productes es visualitzen en una electroforesis en gel d'agarosa o poliacrilamida. Aquest mètode presenta inconvenients alhora de que no es poden valorar totes les localitzacions de les CpG donat la dependència del enzim de restricció amb la seva diana i la possible formació d'heteroduplex entre cadenes metilades i no metilades i veure's alhora afectat per una conversió incompleta de les CpG no metilades esdevenint dianes falsament positives [85].

4.4.2.3.4. MS-SnuPE.

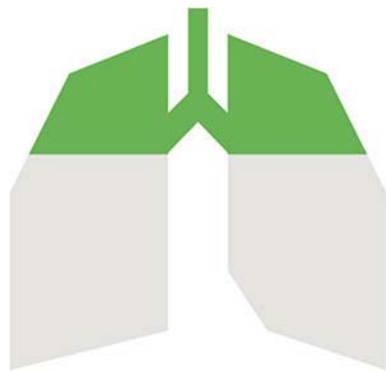
El producte generat per l'amplificació per PCR utilitzant MIP de la seqüència d'estudi s'aïlla per mitjà d'una electroforesis en gel. Posteriorment es fa hibridar amb *primers* interns que acaba justament en l'extrem extrem 5' del nucleòtid que es vol analitzar, en aquest cas tractant-se d'un anàlisi de metilació, davant d'una CpG. Posteriorment es realitza una extensió del DNA per mitjà d'una DNA polimerasa que només disposa de dCTP i dTTP marcat amb ³²P. Posteriorment es visualitzen els productes obtinguts en gels de poliacrilamida i podent-se quantificar per l'emissió del fòsfor. Per tal d'evitar un possible biaix en la hibridació dels *primers* interns s'ha d'evitar que aquest es s'uneixin a CpG en la seqüència d'origen fet complicat en regions denses en CpGs com són les illes dels promotors [86].

corresponent a les molècules metilades i l'altre a les molècules no metilades. El límit de detecció, que depèn del disseny de l'assaig, pot ser del 5% d'al·lels metilats metilat sobre el DNA no metilat quan s'utilitzen *primers* amb disseny MIP sense incloure CpGs. Si la seqüència objectiu és molt extensa i presenta una metilació de la seqüència heterogènia, donarà lloc a complexos patrons de melting. L'anàlisi de la variació de la fluorescència respecte al temps (-dF/dT) genera corbes de melting que permeten discriminar els 3 estats de metilació possibles: no metilat, completament metilat i heterogèniament metilat (Figura 9) [78]. Concretament la variació es deu al decaïment de la fluorescència, ja que els agents fluorescents ho són únicament al intercalar-se en la doble cadena, fet que al incrementar gradualment la temperatura es produeix la deshibridació de la doble cadena de DNA i per tant l'alliberació del agent intercalant deixant de ser fluorescent. El fet invers és la base permet fer la quantificació a temps real al detectar l'increment de fluorescència en cada cicle durant l'amplificació de cada cicle de PCR [88].

4.4.2.3.7. MS-HRM.

Basat en el MCA incorpora diverses millores metodològiques envers el MS-MCA. Incrementa de manera substancial el nombre d'adquisicions obtenint unes corbes de melting més nítides i permetent captar diferències molt subtils en les seqüències. Donat l'elevat control sobre les variacions de temperatura que ofereix l'instrumental, permet realitzar canvis de temperatura molt petits comportant un relatiu alt rendiment del procés. En l'HRM

s'utilitzen agents intercalants fluorescent a concentracions saturants sense que es produeixi la inhibició de la PCR, com és el SYBR-Green I. En l'HRM tradicionalment s'ha emprat *primers* MIP, actualment existeix la premissa de corregir el biaix i incrementar la sensibilitat analítica afegint un nombre limitat de CpGs en la seqüència dels *primers* aproximant la metodologia als paràmetres de MSP [80]



MATERIALS I MÈTODES

RUGTTTRUUUGURGTTTTTRUTGATAGAUATTTATTTUTTGGGATG TTTUUTGATGGGGG

MATERIALS i MÈTODES

5.1. PROCESSAMENT I PREPARACIÓ DE MOSTRES.

5.1.1. Mostres Clíniques

5.1.1.1. Projecte PLAMET.

Inicialment el projecte es va dur a terme en el marc d'un programa institucional anomenat ICOBIOBANC, desenvolupat per a la gestió i processament mostres biològiques de pacients que havien de ser tractats a l'Institut Català d'Oncologia (ICO) per malalties d'origen neoplàsic i divers. Aquest programa va entrar en funcionament el gener de 2005. Pel que concerneix a aquest projecte, els pacients diagnosticats de CP que eren atesos a l'ICO, eren informats de l'existència d'aquest programa de recollida de mostres i se'ls plantejava la possibilitat d'obtenir mostres de sang i esput espontani, si donaven el seu consentiment. Les mostres eren obtingudes en la unitat d'hospitalització quan els pacients estaven ingressats o en les consultes externes si eren ambulatoris abans que iniciessin el tractament oncoespecífic. Posteriorment es realitzava una extracció sanguínia i es recollia una mostra d'esput espontani. Les mostres eren etiquetades de manera que quedés preservada la confidencialitat i remeses al Laboratori de Recerca Translacional (LRT). En arribar eren registrades i processades de manera que s'obtinguessin alíquotes d'1 ml de sèrum, plasma, leucòcits, pèl·let i sobrenedant d'esput. Immediatament després s'emmagatzemaven en congeladors a -80°C .

5.1.1.2. Teixits

Les mostres de tumors primaris de CPCNP es van obtenir en el moment de la cirurgia a l'Hospital Universitari de Bellvitge de L'Hospitalet de Llobregat durant el període 2001-2008. Aquestes biòpsies van ser immediatament posades en gel i posteriorment congelades a -80°C i emmagatzemades al servei d'anatomia patològica del mateix hospital. Totes les mostres van ser obtingudes amb el consentiment informat dels pacients o dels seus responsables legals.

Es va seleccionar un primer grup de 20 parelles de mostres compostat per biòpsies del tumor primari aparellades amb la seva mostra de teixit no tumoral associat on hi eren representades les diferents histologies de CPCNP: 9 SCC (45%), 8 ADC (40%) i finalment 3 CCG (15%).

Un cop verificats i acceptats els paràmetres sobre l'assaig es van estudiar 86 tumors primaris d'ADC en els quals es troben representats tots els estadiatsges del TNM en CP, des del I al IV.

Un cop obtingudes i rebudes les mostres al laboratori per al seu processament es van incloure totes les mostres de teixit fresc congelat en OCT. Posteriorment es van realitzar una sèrie de talls en sandvitx (apartat següent) per tal de recopilar material per les posteriors extraccions d'àcids nucleics i alhora comprovar la integritat de la mostra, essent aquestes analitzades per un anatomopatòleg. Tots els portaobjectes van ser tractats prèviament amb un 10% de poli-L-lisina. Una vegada adherits els talls sobre el portaobjectes es van deixar assecar i seguidament es van congelar a -20°C fins al seu processament.

5.1.2. Mètode de tall en sandvitz:

- a) 2 talls de 4 μ m recollits sobre un portaobjectes per a la validació histològica.
- b) 5 talls de 10 μ m recollits en un *ependorf* per a l'extracció d'aa.nn.
- c) 2 talls de 4 μ m recollits sobre un portaobjectes per a la validació histològica.
- d) 4 talls de 2 μ m recollits sobre 2 portaobjectes per a estudis posteriors.
- e) 5 talls de 10 μ m recollits en un *ependorf* per a l'extracció d'aa.nn.
- f) 2 talls de 4 μ m recollits sobre un portaobjectes per a la validació histològica.

Els portaobjectes corresponents als talls 1, 3 i 6 es van tenyir per la tècnica d'Hematoxilina - Eosina per tal que el servei d'anatomia patològica confirmés una presència tumoral superior al 50% i existís una homogeneïtat de la mostra durant el successius talls.

5.1.3. Línies i controls cel·lulars.

Per a determinar el correcte funcionament de la tècnica i establir els paràmetres d'especificitat i sensibilitat es van emprar diverses línies cel·lulars tumorals humanes caracteritzades per al seu estat de metilació.

Les línies que es van utilitzar que complien la funció de controls positius per al diversos GST i miRNAs analitzats foren·

- HCT116· Línia cel·lular immortalitzada a partir de cèl·lules d'un carcinoma primari de còlon [89].
- A549· Línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules de l'epiteli basal d'ADC alveolar humà [90].
- A427· Línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules epitelials d'ADC.
- LC-1/sq· Línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules epitelials d'SCC.
- EBC1· Línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules epitelials d'SCC.
- 140N· Cultiu cel·lular immortalitzat de teixit pulmonar amb característiques no tumorals.
- CALU3· Línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules de vessament pleural en ADC.

En l'obtenció de controls negatius o també anomenats control no metilat és va utilitzar el kit Repli-G (Qiagen, Hilden, Germany) per tal d'amplificar el genoma complet del DNA genòmic de limfòcits, proporcionant una gran quantitat de DNA (~5µg) totalment lliure de metilacions.

5.1.4. Extracció del DNA genòmic.

5.1.4.1. Mostres ICOBIOBANC, teixits i línies cel·lulars.

L'extracció del DNA tumoral es va realitzar per mitjà d'una solució salina a temperatura ambient per evitar la precipitació de sals, tant a partir del talls de teixits recollits en un dels eppendorfs com per els pèl·lets recollits de les línies cel·lulars i les mostres ICOBIOBANC. Prèviament s'havia realitzat un rentat amb PBS per tal d'eliminar les restes d'OCT. Arribats a aquest punt, destacar que es processen de la

mateixa manera els pèl·lets obtinguts de limfòcits i línies cel·lulars tumorals immortalitzades.

A cada eppendorf de mostra se li va afegir 1 mL de solució d'extracció (0,05 mM EDTA pH 8, 2 mg/mL proteïnasa K, 0,1% SDS, 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8) i es va deixar a 56°C i en agitació tota la nit. L'endemà es va centrifugar a 20.000g durant 5 minuts per precipitar restes cel·lulars. Es va recuperar la fase aquosa i aquesta es va barrejar per inversió amb clorur sòdic (mostra·NaCl 5M; 1·0,6; v·v). Després de centrifugar a 20.000g durant 30 minuts es va transferir el sobrenedant a un nou eppendorf per separar la fase aquosa (on es troba el DNA) de la fase orgànica (RNA i proteïnes) i es va precipitar el DNA amb 0,6 volums d'isopropanol i 5 µL de glucògen durant un mínim de 3 hores a -80°C. Transcorregut aquest temps es van centrifugar les mostres a 20.000g durant 15 minuts a 4°C per a recuperar els pèl·lets de DNA i es va procedir a fer 2 rentats amb etanol 70% de 15 minuts a 20.000g. Per últim, es van eixugar els pèl·lets i es van resuspendre en 50 µL d'aigua destil·lada.

5.1.5. Quantificació i determinació de la integritat del DNA

El DNA es va quantificar per mitjà d'espectrofotometria a 260 nm en un espectrofotòmetre NanoDrop i la seva puresa es va determinar a través del quocient de l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. En una aproximació de la puresa, es considera que la relació A_{260} / A_{280} ha de ser proper a 2. La seva integritat es va determinar per mitjà d'electroforesi en gels d'agarosa al 2% tenyits amb BrEt.

5.1.6. Transformació del DNA amb bisulfit sòdic.

Es va utilitzar el kit comercial EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research Corp., Orange, CA), que té una elevada eficiència (>99% de les citosines no metilades es transformen a uracil) que permet recuperar més del 75% del DNA d'acord amb el protocol del fabricant. Es va utilitzar 1µg dels DNAs obtinguts en les extraccions dels teixits i les línies cel·lulars de mode que al final del procediment obteníem la conversió final en 30 µl d'aigua destil·lada. Es va optar per una transformació amb un kit comercial per tal d'aconseguir la major homogeneïtat en la conversió de les mostres i evitar errors d'utilitatge i manipulació presents en l'elaboració manual. Per altra banda, per tal d'establir un control de l'efectivitat de les transformacions en cada tanda de conversions s'incorporaven DNAs control no metilats de manera que al realitzar el assajos de avaluació de l'estat de metilació, en cas de trobar algun d'aquests DNA positivament metilat, podríem deduir que la transformació ha estat fallida o incompleta.

5.2. MARCADORS.

Els gens estudiats pertanyen a diferents rutes i amb diferents papers en el cicle cel·lular.

5.2.1. Target of methylation-induced silencing 1 (*TMS1*)

TMS1 és un gen que juga un paper crucial en provocar la inflamació i la mort cel·lular, fet que fa que aquest sigui un bon candidat a gen supressor tumoral amb propietats proapoptòtiques [91]. *TMS1* està normalment altament expressat en les cèl·lules del sistema immunitari, particularment en els neutròfils i també en els macròfags i monòcits. Estudis previs han demostrat que *TMS1* s'indueix en aquests tipus de cèl·lules en resposta a estímuls proinflamatoris com la IL-1 β , LPS i TNF- α [92, 93], encara que el mecanisme exacte d'aquesta regulació no està totalment establert. Tanmateix, *TMS1* també s'expressa en molts tipus de cèl·lules epitelials, com el teixit mamari normal, expressant-se selectivament en l'epiteli ductal i lobel·lar, però està absent del mioepiteli subjacent i a les cèl·lules de l'estroma [94]. En l'actualitat se sap poc sobre els factors que regulen l'expressió normal de *TMS1* a la vegada que la funció de la proteïna en les cèl·lules d'origen no immunitari no ha estat àmpliament estudiat [95]. *TMS1* codifica una proteïna que conté un adaptador dividit en dos parts, la part N-terminal de domini pirina (PYD) i un domini C-terminal de reclutador de la Caspasa (CARD), que són dos membres de la superfamília de dominis de mort, responsables de la interacció proteïna-proteïna i que es troben en les proteïnes que tenen funcions en la regulació de l'apoptosi i la inflamació. La importància potencial de *TMS1* com un supressor tumoral es fa palesa en les observacions de silenciament transcripcional del gen

mediat epigenèticament en càncer. Aquest silenciament, associat a la metilació aberrant de la regió del promotor en les illes CpG, s'ha observat per *TMS1* en múltiples tipus de càncer [96-100]. Aquest silenciament contribueix a la carcinogènesi en la mesura que permet a les cèl·lules evitar l'apoptosi i poden conferir resistència als agents quimioterapèutics contra el càncer.

En recents estudis es reporta que la funcionalitat de *TMS1* pot ser un esdeveniment fonamental per a la progressió i posterior metastasi en les últimes etapes del CP, ja que s'observa que la hipermetilació de *TMS1* està estretament correlacionada amb la invasió limfàtica i la afectació metastàtica dels ganglis limfàtics en l'ADC, però no en el SCC. Aquests canvis, quan es presenten amb poca freqüència en els tumors en estadi I, no prediuen la recurrència ni es relaciona amb una pitjor supervivència. Un fet molt rellevant que expressa el potencial com a biomarcador és la manca de metilació en el 98% de les mostres d'esput de persones que fumen molt, però no presenten signes clínics de càncer, suggerint una alta especificitat per a la predicció del càncer a través d'aquest marcador [95, 98, 101, 102].



Figura 10. Localització genòmica del gen *TMS1*.

5.2.2. Adenomatous Polyposis coli (APC)

El gen *APC* és un gen supressor de tumors que codifica per una proteïna que actua com antagonista de la via de senyalització de Wnt, actuant en processos de migració cel·lular, adhesió, activació de la transcripció i

l'apoptosi; principalment per la inactivació de la β -Catenina. Diverses alteracions produïdes en el gen són les causants de la Poliposis Adenomatosa Familiar, malaltia premaligna autosòmica dominant que evoluciona cap al càncer. Les mutacions en somàtiques d'*APC* són presents en la majoria dels carcinomes colorectals [103, 104], produint-se el 60% d'aquests dins de la regió clúster de mutació (acrònim en anglès MCR), una petita regió de l'exó 15 entre els codons 1286 i 1513. Mentre que el 18% dels càncers de mama, a diferència del colorectal, tenen mutacions somàtiques i majoritàriament fora de l'MCR. Aquestes mutacions condueixen a una manca de degradació i acumulació nuclear de β -Catenina que actua com un activador transcripcional causant la pèrdua de control del creixement cel·lular [105]. Tanmateix les mutacions són rares o absents en altres tipus de càncers com el CPCNP [106]. No obstant, les pèrdues al·lèliques en 5q21 són freqüents en la mama i en CP [107, 108], fet que suggereix que altres mecanismes són els causants d'inactivar l'altre al·lel. Arrel de diferents estudis en càncers gastrointestinals, colorectals i altres [109, 110], la inactivació per metilació del promotor podria representar el suposat mecanisme que fa minvar la funció del gen *APC* en CP. En estudis recents, es mostra una alta freqüència de metilació del promotor 1A del gen *APC* en el CP. Aquesta metilació del promotor d'*APC* també va ser detectada en mostres de sèrum i plasma, proporcionant un nou enfocament per a les proves de diagnòstic precoç i el seguiment del CP. S'ha reportat que la hipermetilació aberrant del promotor 1A del gen *APC* i la pèrdua del seu transcrit específic és freqüent en els càncers de CPCNP, en línies cel·lulars immortalitzades i en menor mesura, en línies cel·lulars de CPCP, tot evidenciant que alts nivells de DNA metilat d'*APC* en el teixit tumoral és un factor predictiu independent de pitjor supervivència [111, 112].

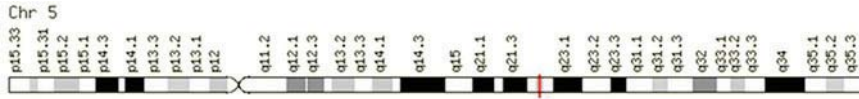


Figura 11. Localització genòmica del gen APC.

5.2.3. Ras associated domain factor (*RASSF1A*)

RASSF1A es el transcrit principal del gen *RASSF1* que codifica per a una proteïna amb múltiples funcions, formant part d'una família de sis proteïnes relacionades que a la vegada presenten múltiples variants per splicing contenint un domini putatiu d'associació amb la proteïna Ras, en la part C-terminal, fet que ha condicionat el seu nom. La proteïna *RASSF1A*. Està implicada en la regulació de la dinàmica dels microtúbuls de l'apoptosi i del cycle cel·lular, relacionant-se també amb l'estabilitat genòmica. S'ha demostrat per mitjà de nombrosos estudis que la sobreexpressió de *RASSF1A* promou l'apoptosi, la detenció del cycle cel·lular i redueix la tumorigenicitat de les línies cel·lulars de diferents tipus de càncers [113, 114]. El locus de *RASSF1* en 3p21.3 s'estén per aproximadament 11.000 parells de bases, involucrant vuit exons amb splicing alternatiu i conté dos promotors diferents que donen lloc a vuit transcripcions diferents. Pel que fa a la inactivació epigenètica anteriorment mencionada, existeixen dues illes CpG associades amb per cada promotor de *RASSF1*. L'expressió de *RASSF1A* es perd en una àmplia varietat de tumors humans, silenciats fonamentalment com a resultat de la hipermetilació del promotor. L'alta freqüència amb què *RASSF1A* està silenciada en els tumors suggereix que juga un paper fonamental en el desenvolupament del càncer humà. Diversos estudis mostren que el silenciament per metilació en CP es

presenta de forma diferenciada segons el tipus histològic, amb una elevada presència en CPCP (90% -70%) i més disminuït en CPCNP (50% -30%), tanmateix, en tots dos casos associant-se amb una recidiva precoç. Per tant, *RASSF1A* representa un important objectiu amb potencial diagnòstic i terapèutic, ja que la reactivació per desmetilació del promotor presentaria un nou enfocament terapèutic [113-115].

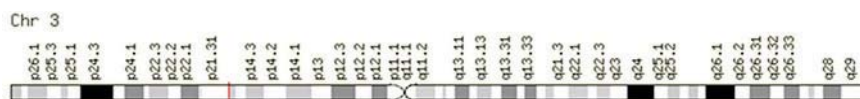


Figura 12. Localització genòmica del gen *RASSF1A*.

5.2.4. Insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)

IGFBP3 forma part de la família de proteïnes d'unió al factor de creixement de semblants a la insulina (IGF), compostat per 6 proteïnes diferents i essent IGFBP-3 la més abundant. Aquest gen codifica per una proteïna amb domini tiroglobulina tipus I i un altre domini IGFBP. La proteïna forma un complex ternari de 150 KDa conjuntament amb la subunitat àcid-làbil del IGF (ALS) i amb el IGF1 o el IGF2. Aquesta actua com a reguladora de l'activitat de diferents IGFs a distància dels seu receptor en el medi extracel·lular o en corrent circulatori, inhibint l'acció mitòtica i antiapoptòtica dels IGFs [116-119].

L'expressió d'*IGFBP3* és induïda per diferents agents antiproliferatius i proapoptòtics com el TGF- β 1, TNF- α , l'àcid retinoic, la vitamina D i anàlegs; i el factor de transcripció p53 [116, 118, 119]. Per altra banda s'ha demostrat la repressió de l'expressió per l'aparició de polimorfismes o bé per mitjà de la metilació de la regió promotora del gen [117, 120, 121].

La sobre expressió d'IGF i *IGFBP3* s'ha descrit a una ampla varietat de tumors però establint-se una correlació negativa entre els nivells de sèrum d'IGFBP-3 i el risc de patir càncer de pulmó [117, 120-123]. Aquesta correlació suggereix un paper protector enfront els efectes sistèmics dels IGFs, que tanmateix tenen una activitat antiproliferativa i proapoptòtica independent dels IGFs, com s'ha descrit en estudis tot induint la sobreexpressió d'*IGFBP3* amb cèl·lules carents del receptor de IGF-1 actuant probablement per mediació d'altres receptors cel·lulars com el TGF- β . Aquesta afirmació va ser confirmada a nivell de CPCNP per estudis amb sobreexpressió d'IGFBP-3 on es descrivia que aquest té efectes significatius com a inhibidor del creixement en CPCNP, tant in vitro com in vivo. Posteriorment es va demostrar que la hipermetilació d'IGFBP-3 és un fenomen freqüent i fortament associat a un pitjor pronòstic i supervivència en CPCNP. Aquesta afirmació confirmava el paper protector d'IGFBP-3 existint una correlació negativa entre els nivells sèrics d'IGFBP-3 nivells i el risc de patir un CP [117, 120-123].

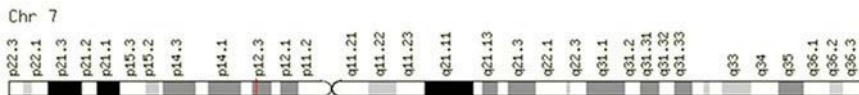


Figura 13. Localització genòmica del gen IGF3.

5.2.5. Cadherin 13 (*CDH13*)

El gen de la cadherina 13, T o H (heart) com també se'l pot anomenar, forma part de la superfamília de les cadherines que codifica per un a proteïna que a diferència de la resta de la família ha perdut el domini citosòlic i el domini transmembrana, perdent el contacte amb el citoesquelet i restant

ancorada a la membrana cel·lular per un glicosilfosfatidilinositol (GPI) perdent així la capacitat d'adhesió cèl·lula - cèl·lula, tret característic de la família de les cadherines. Per altra banda destacar que la seva activitat està vinculada a les proteïnes lipídiques de baixa densitat (LDL) que tenen un efecte de control hormonal sobre la mobilització de Ca^{2+} , incrementant així la migració cel·lular. La pèrdua d'expressió de les cadherines s'ha descrit en molts càncers d'origen epitelial, destacant el seu paper rellevant en la invasió cel·lular i metàstasi [124-127]. En diversos estudis s'ha constatat que la expressió de *CDH13* es redueix en diversos tumors humans introduint i posteriorment confirmant la hipòtesi que aquest gen funciona com un gens supressors de tumor. Tanmateix diversos estudis han reportat que l'expressió de *CDH13* està freqüentment silenciada per la metilació aberrant de la regió 5' del gen en càncer de mama i CP) [128, 129]. Per altra banda, en tumors ovàrics, s'ha observat la combinació de deleció i metilació aberrant per a inactivar *CDH13* [130]. No obstant això, a partir de diversos estudis s'ha trobat una bona concordança entre el silenciament gènic i la metilació aberrant d'aquesta regió 5' del promotor de *CDH13* [127].



Figura 14. Localització genòmica del gen *CDH13*.

5.2.6. p16/CDKN2

És un dels gens supressors de tumors per excel·lència, com hem comentat anteriorment en l'apartat de gens supressors tumorals d'aquesta introducció, jugant un paper determinant en el control del cicle cel·lular.

p16 també anomenat CDKN2 genera diferents variants transcripcionals que difereixen en els seus *primers* exons. Es coneixen tres productes produïts per splicing alternatiu que codifiquen per proteïnes diferents. Dos d'aquest transcrits codifiquen per isoformes estructuralment relacionades que inhibeixen l'activitat de la CDK4 cinasa. El tercer transcrit conté un marc obert de lectura alternatiu, conegut com ARF (acrònim en anglès) que codifica per una proteïna no relacionada estructuralment amb les altres isoformes. La proteïna ARF actua estabilitzant la proteïna supressora de tumors p53, ja introduïda en l'apartat gens supressors de tumors. Interactua segrestant la proteïna responsable de la degradació de p53, la MDM2. D'aquesta manera a través de les inhibicions i amb la regulació de CDK4 i p53 respectivament, els diferents productes del gen de p16 exerceixen un paper comú, clau en la progressió del cicle cel·lular, exercint el seu control a nivell de G1 [131-133]. p16 és un gen que trobem molt freqüentment mutat i deleccionat en el càncer humà, fent-se palesa el seu paper clau en la carcinogènesi. És ja una evidència genètica que p16 s'inactiva de forma precoç en molts tumors primaris on es destaquen tres alteracions principals en humans que inactiven el gen p16, la mutació, la deleció homozigòtica o la hipermetilació del promotor [132]. En línies cel·lulars de CP p16 es troba inactivat en més del 70% de les línies corresponents a la histologia de CPCNP [131, 133, 134] amb una incidència superior en SCC respecte dels ADC. Aquesta inactivació ve produïda principalment per una deleció homozigòtica i/o en associació amb el silenciament per hipermetilació de la regió promotora, podent aquesta última alteració precedir la inestabilitat genètica [132, 134]. La metilació aberrant de p16 és freqüent a les primeres etapes de la carcinogènesi respiratòria i es demostra l'ús potencial d'aquest

canvi epigenètic com un biomarcador per a identificar les persones d'alt risc o amb neoplàsia de pulmó [132, 134, 135].

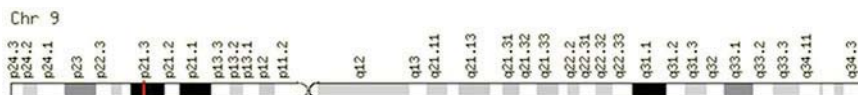


Figura 15. Localització genòmica del gen p16.

5.2.7. microRNA - 34b/c

miR-34 forma una família de microRNAs conservada evolutivament en el genoma dels vertebrats amb tres membres, el miR-34, el miR-34b i el miR-34c. Existeixen dos loci per al miR-34, un codificant per a miR-34a i una altre donant lloc a miR-34b i miR-34c (miR-34b/c) com a únic transcrit primari inicial. Ambdós loci, miR-34a i miR-34b/c són regulats directament per la interacció de p53 per mitjà de seqüències consens que ofereixen un lloc d'unió amb p53 en les regions promotores proximals dels gens, fet demostrat a través de diversos treballs mitjançant la immunoprecipitació de cromatina [69, 136-139] i per la capacitat del promotor de miR-34 de regular l'expressió de luciferasa de forma dependent de p53 [69, 136, 137]. Anteriorment a la relació de la família del miR-34 amb p53, els vincles inicials amb la tumorigènesi es van establir per la relació de la pèrdua d'expressió en neuroblastoma i va ser poc després quan es va relacionar els nivells de miR-34 amb l'estat de p53 [137-139]. L'activitat produïda per l'activació de miR-34 pot variar segons el tipus cel·lular ja que en alguns casos l'expressió ectòpica o la introducció de formes sintètiques mimètiques de miR-34 ha donat com a resultat l'aturada del cicle cel·lular, la senescència o en d'altres casos el resultat va ser

l'apoptosi reduint-se per inhibició o depleció del miR-34 [69]. S'atribueix aquesta variabilitat en la resposta a la gamma d'objectius de regulació de miR-34 que s'expressen segons el tipus cel·lular determinat. Tanmateix s'ha descrit una major expressió dels nivells de miR-34a respecte miR-34b/c en la majoria de tipus cel·lulars excepte en el pulmó on l'expressió predominant és la de miR-34b/c, fet que constata l'afirmació anterior respecte que l'expressió i la funció és teixit específica [137]. En ambdós loci s'ha demostrat la presència d'illes CpG i aquestes s'han relacionat amb la hipermetilació d'aquestes amb diversos tipus de càncers, inclòs el CP [140-142]. La hipermetilació del DNA de miR-34b/c és un esdeveniment relativament comú en CPCNP considerant-se com un factor pronòstic negatiu destacant com un dels esdeveniments claus en la formació de metàstasis en CPCNP i altres tipus de càncers [142, 143].



Figura 16. Localització genòmica del gen miRNA-34b/c.

5.2.8. micro RNA-148a

El miR-148a és un microRNA que juga un paper regulador en diferents càncers, entre ells el càncer de mama i el càncer gàstric indiferenciat. En el seu paper regulador se li atribueixen diverses dianes directes en la seva activitat: TGIF2, reduint-ne els nivells de proteïna; la DNA Metiltransferasa 3B (DNMT3B) amb la qual es pot especular sobre la relació d'una baixa expressió de miR-148 a l'inici de les lesions preneoplàsiques comportant una sobreexpressió de DNMT3B i per tant a la inactivació de

gens supressors tumorals; i el receptor de pregnano X (PXR), que és el principal factor regulador d'una gran varietat de transportadors i enzims que metabolitzen molts compostos farmacèutics [143-145]. La regió codificant de miR-148 es troba a les proximitats de 2 illes CpG, llur metilació del DNA s'associa al silenciament de l'expressió de miR-148 en línies cel·lulars de diversos càncers humans [143]. La hipermetilació en el tumor primari s'ha associat a metàstasi ganglionar. Es suggereix doncs, que l'ús de marcadors de metilació de miRNAs es postula com una eina per predir el pronòstic del tumor i el comportament metastàtic, malgrat destacar que, tot i la evidència del paper dels miRNAs en la progressió tumoral, el mecanisme subjacent a la desregulació en el càncer encara no ha estat completament aclarida [146].



Figura 17. Localització genòmica del gen miRNA-148a.

5.3. METODOLOGIA:

Durant el transcurs d'aquest projecte es va plantejar quina era la millor aproximació metodològica per tal de poder establir d'una forma ràpida i fiable l'estat de metilació i que alhora aportés una elevada sensibilitat sense comprometre l'especificitat, com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat mètodes de PCR de la introducció. A continuació es presenten tots el procediments d'optimització, caracterització i comparació dels diferents mètodes presentant així l'evolució de l'enfocament metodològic inicial per mitjà de la MSP, *gold standard* fins el moment, fins a la tècnica escollida per a realitzar l'avaluació dels estats de metilació, la BS-MCA.

5.3.1. Estudi PLAMET

Com s'ha fet referència anteriorment, el projecte inicialment es va centrar en un seguit de mostres procedents del programa ICOBIOBANC, corresponents a la malaltia del CPCNP i on l'objectiu principal era poder arribar a identificar algun biomarcador que permetés el monitoratge i el pronòstic en el CPCNP a mode exploratori. A desembre de 2007, període en qual sorgeixen els resultats corresponent aquest conjunt mostral, comptava amb 329 malalts de CP amb una mitjana d'edat= $62,72 \pm 9,75$ [35-83] sent el 12% dels pacients de gènere femení. La nostra estratègia es va centrar en l'estudi de metilació aberrant en la regió promotora de possibles gens candidats ja reportats amb més potencial per a la translació a la pràctica clínica.

Aquests marcadors seleccionats haurien de complir amb la premissa de les condicions teòriques d'un bon marcador per al CP, com són:

- a) Fàcil accessibilitat sense causar molèsties ni danys als pacients (mostres no invasives), com serien en aquest estudi les mostres de sèrum, plasma i esputs espontanis.
- b) Absència del marcador en pacients sense la malaltia.
- c) Un assaig únic per a cada marcador que serveixi per a tots els pacients.

Atès aquestes característiques ideals, la mostra d'esput es prestava com a la candidata més adient. Tanmateix no es va deixar de avaluar l'estat de metilació de GST i mRNAs en mostres de plasma i sèrum.

Finalment i atès que la metilació d'un sol gen és relativament baixa, es va plantejar l'estudi simultani d'un panell de gens podia tenir un major potencial per assolir la identificació dels biomarcadors amb les característiques anteriorment esmentades. Aquesta part de l'estudi es va dur a terme al Laboratori d'Epigenètica del Càncer del Dr. Manel Esteller al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

5.3.1.1. Sèrie mostral

En aquesta abordatge exploratori es van utilitzar DNAs bisulfitats de 41 esputs espontanis, 60 plasmes i 82 sèrums de diverses histologies i estadiatges de CP sense coneixement de l'estadi clínic de la mostra i molts sense mostra de biòpsia tumoral associada, no parafinada.

5.3.1.2. Marcadors analitzats

5.3.1.2.1. Gens supressors tumorals

Com a bloc principal inicial i essencial de l'abordatge es pretenia estudiar l'estat de metilació per als gens *TMS1*, *APC*, *CDH1* i *DAPK* a través de la utilització de la tècnica d'anàlisi MSP. Independent dels resultats obtinguts es va ampliar la prospecció de marcadors per als gens *RASSF1A*, *CDH13*, p16, TIMP3, 14-3-3s, MGMT, RAR β 2. (Taula 1).

Taula 1. Seqüència de primers per a l'assaig MSP:

| | |
|----------------|----------------------------------|
| RARB2 | |
| U-F | TTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTT |
| U-R | CTTACTCAACCAATCCAACCAAAACAA |
| M-F | TGTCGAGAACGCGAGCGATTTC |
| M-R | CGACCAATCCAACCGAAACGA |
| RASSF1A | |
| U-F | GGTTTTGTGAGAGTGTGTTAGTTTT |
| U-R | CCCCAACTTCAACACCTCC |
| M-F | CGAGAGCGCGTTTAGTTTC |
| M-R | AACCCCGACTTCAACGCC |
| HMHLH1 | |
| U-F | TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT |
| U-R | ACCACCTCATCATAACTACCCACA |
| M-F | ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC |
| M-R | CCTCATCGTAACTACCCGCG |
| APC | |
| U-F | GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT |
| U-R | CCAATCAACAAACTCCAACAA |
| M-F | TATTGCGGAGTGCGGGTC |
| M-R | TCGACGAACTCCCGACGA |
| CDH1 | |
| U-F | TGGTTGTAGTTATGTATTTATTTTAGTGGTGT |
| U-R | ACACCAAATACAAATCAAACCAA |
| M-F | CGAATACGATCGAATCGAACCG |
| M-R | TGTAGTTACGTATTTATTTTAGTGGCGTC |
| TIMP3 | |
| U-F | TTTTGTTTTGTTATTTTTGTTTTGGTTTT |
| U-R | CCCCAAAACCCACCTCA |
| M-F | CGTTTCGTTATTTTTGTTTTCGTTTC |
| M-R | CCGAAAACCCCGCCTCG |
| CDH13 | |
| U-F | TTGTGGGGTGTTTTTTGT |
| U-R | AACTTTCATTACATACACA |
| M-F | TCGCGGGTTCGTTTTTCGC |
| M-R | GACGTTTTATTACATACACGCG |
| 14-3-3s | |
| U-F | ATGGTAGTTTTATGAAAGGTGTT |
| U-R | CCCTAACCACCCACCACA |
| M-F | TGGTAGTTTTATGAAAGGCGTC |
| M-R | CCTTAACCGCCACCACG |
| TMS1 | |
| U-F | GGTTGTAGTGGGGTGAGTGGT |
| U-R | CAAAACATCCATAAACAACAACA |
| M-F | TTGTAGCGGGTGAGCGGC |
| M-R | AACGTCCATAAACAACAACGCG |

5.3.1.2.2.miRNAs

Es va voler analitzar l'estat de metilació del gen corresponent al mir-124a1, en estudi al Laboratori per a diferents tipus tumorals. En aquest abordatge es va dividir en dues etapes. Una primera utilitzava *primers* per a seqüenciació genòmica per a cadenes de DNA transformades per bisulfit i així per mitjà de un procés de clonació i seqüenciació poder determinar l'estat de metilació de mir-124a1 per a les diferents línies de CP i les CpGs involucrades. Posteriorment, i com a segona etapa, el mateix estudi de les línies cel·lulars es va dur a terme per mitjà de l'MSP amb *primers* específics per a cada condició de metilació (Taula 2). Seguidament i un cop contrastats el resultats amb el anteriors, aquest miRNA es va avaluar en un grup exploratori del total de mostres de sèrum disposades per a ser analitzades, conjuntament amb un grup control.

De forma paral·lela i complementàriament es va estudiar la presència i l'estat de metilació de diversos miRNAs en les línies cel·lulars de CP per mitjà de seqüenciació genòmica específica per a bisulfit. Els miRNAs analitzats foren mir-140a, mir-130a, mir-517c, mir-208, mir-346, mir-let7a-3, mir-126, mir-9-3, mir-24-1, mir-187, mir-200c, mir-296a, mir-203, mir-R127, mir-139, mir-323, mir-299 i mir-378 (Figura 18). Els resultats finals no es mostren en aquesta tesi ja que el treball no es va poder concloure i ser avaluats per MSP donat el temps de l'estància i al no reempendre l'estudi per un nou abordatge del projecte.

Taula 2. Seqüència de primers per a seqüència de bisulfit i MSP de miR-124a1:

| miR-124a1 | |
|-----------------------|---------------------------|
| Seqüència de Bisulfit | |
| BS-F | AAGGATGGGGGAGAATAAAGAGTTT |
| BS-R | CTCAACCAACCCATTCTTAACATT |
| MSP | |
| U-F | AATAAAGAGTTTTGGGAGATGTT |
| U-R | AAAAAATAAAAAACAACACATATAC |
| M-F | AAAGAGTTTTGGGAGACGTC |
| M-R | AATAAAAAACGACGCGTATA |

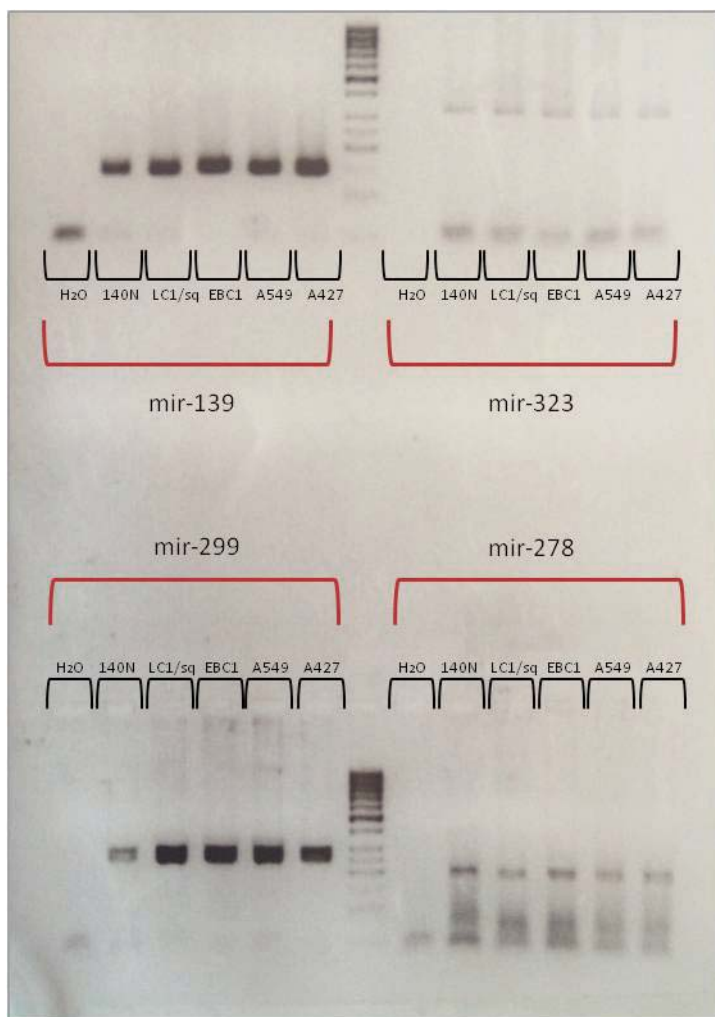


Figura 18. Exemple d'anàlisi per PCR de seqüència genòmica específica de bisulfit en diversos miRNAs. Bandes de DNA obtingudes al córrer en paral·lel els productes de PCR obtinguts en l'amplificació per PCR per als miRNAs en les línies cel·lulars control (140n), i de CP tant per SCC (LC1/sq i EBC1) com per ADC (A549 i A427).

5.3.1.3. Methylation Specific PCR (MSP)

En aquest estudi inicial es va utilitzar la tècnica d'anàlisi de metilació més emprada en la majoria d'estudis del moment l'MSP, utilitzant *primers* específics de seqüència metilada o no metilada. La tècnica, molt sensible, capaç de detectar un al·lel metilat entre 1000 no metilats i amb una gran utilitat per a l'anàlisi de metilació en mostres amb baix contingut de DNA tumoral, com en l'esput, el sèrum i el plasma. Però amb l'inconvenient que existien múltiples factors que podien facilitar una mala conversió amb bisulfit: una concentració molt elevada de DNA, la presència de proteïnes residuals després de l'extracció o una desnaturalització insuficient, entre d'altres.

5.3.1.3.1. Condicions

La reacció de PCR es va dur a terme en un termociclador GeneAmp 7900 (Applied Biosystems). Les etapes d'amplificació constaven de la següent barreja de reacció: 1.5µl del buffer de reacció 10x de la casa Biorline, 1.5µl de dNTPs [2mM], 0.04µl de cada *primer* [2mM], 0.06µl de la Taq Immolase™ (Biorline, London, UK) [5u/µl] i 0.65µl ó 0.5µl de MgCl₂ [50mM] en la primera i la segona PCR respectivament i finalment amb aigua destil·lada fins al volum final. El protocol d'amplificació va ser el següent: 95°C durant 7 minuts, després d'una desnaturalització a 95°C durant 30 segons; 30 segons d'annealing a la temperatura òptima del *primer* i una extensió a 72°C durant 30 segons durant 30 cicles, seguit d'una extensió de 8 minuts finals. El protocol d'amplificació es va dur a terme a partir 1µl DNA mostrat bisulfitat. Afegir que tots els

experiments es van repetir per triplicat. Els productes obtinguts es van visualitzar en gels d'agarosa al 2% amb BrEt.

5.3.1.4. Clonació.

Posteriorment als anàlisis per tal de confirmar els resultats obtinguts es procedia a la purificació i clonació per tal de confirmar l'estat de metilació per seqüenciació.

5.3.1.4.1. Purificació de bandes de DNA en gels d'agarosa.

- a) 300 µl de del Guanidina
- b) Desfer el gel en la solució en un bloc tèrmic a 50°C
- c) Barrejar 100ul de isopropanol fins a quedar solució homogènia.
- d) Traspasar a la columna d'elució del *kit*.
- e) Centrifugar 1min a 10.000 rpm.
- f) Decantar
- g) Afegir 750 µl de PE *Buffer*.
- h) Repetir per duplicat una centrifugació d'1min a 10.000 rpm.
- i) Eluir amb 30 µl de *Buffer* d'elució en un nou eppendorf.
- j) Centrifugar 1min a 10.000 rpm per obtenir la elució de DNA purificat.

5.3.1.4.2. Extensió per cues de poliadenines·

A mode de millorar la inserció en el vector de clonació un cop obtingut el DNA purificat procedíem a realitzar una extensió per adició de cues de adenines per PCR en la terminació del producte anteriorment amplificat.

5.3.1.4.3. Clonatge

El protocol de clonatge per mitjà del vector pGem-T va ser el següent·

- a) Barreja inicial de reacció·
 - 3 µl del producte de PCR purificat.
 - 2,5 µl de Buffer (x10).
 - 0,5 µl de pGem-T.
 - 0,5 µl T4 ligasa.
- b) Es deixa 3h a 15°C o tota la nit a 4°C.
- c) S'utilitzen cèl·lules competents per xoc tèrmic TOPO-TOP10.
- d) Xoc tèrmic a 42°C durant 1 min.
- e) Ràpidament es deixen refredar en gel durant 2 min.
- f) Es recuperen en 600 µl de medi SOC durant 40 min a 37 °C.
- g) Es centrifuga el cultiu 2 min a 10.000 rpm.
- h) Descartem el sobrenedant.
- i) Resuspenem amb medi SOC.
- j) Es realitza un sembrat cel·lular en plaques amb X-gal/IPTG.
- k) Deixar créixer a 37°C durant tota la nit.

5.3.2. Comparativa MSP / MCA

La comparativa de les dues aproximacions metodològiques per PCR es va realitzar amb una regió d'amplificació comuns en els gens d'interès, intentant que compartissin un parell de *primers* d'amplificació. Així, d'aquesta manera, podríem establir quina rellevància prenia la determinació del estat de metilació les CpGs internes de la seqüència envers la simple determinació dirigida a 3 o 4 CpGs concretes, com és el cas que permet la tècnica del MSP. En aquesta aproximació es van utilitzar els DNAs bisulfitat de 20 teixits tumorals de diverses histologies i estadis de CP amb el seu teixit no tumoral associat on els marcadors analitzats van ser *TMS1/ASC*, *APC* i *RASSF1A*.

5.3.2.1. Methylation Specific PCR (MSP)

L'aproximació per MSP que vam utilitzar fou per mitjà d'una PCR anellada. Aquesta es compon de dos passos d'amplificació per PCR posterior a la modificació del DNA pel tractament amb bisulfit sòdic. El primer pas utilitza un conjunt de *primers* (Taula 1) que no conté cap CpG, que anomenarem bisulfit específica, sinó que inclouen algunes citosines que no corresponen a cap CpG, en la posició 3', per tal d'amplificar només la seqüència totalment convertida (veure més endavant). El segon pas de l'MSP utilitza els *primers* convencionals que contenen diverses citosines de CpGs en la posició 3' específicament, existint un parell de *primers* específic segons les seqüències siguin metilades o no metilades.

5.3.2.1.1. Condicions

Les dos reaccions de PCR es van dur a terme en un termociclador GeneAmp 7900 (Applied Biosystems). Les etapes d'amplificació constaven de la següent barreja de reacció: 1.5µl del buffer de reacció 10x de la casa Bioline, 1.5µl de dNTPs [2mM], 0.04µl de cada *primer* [2mM], 0.06µl de la Taq Immolase™ (Bioline, London, UK) [5u/µl] i 0.65µl ó 0.5µl de MgCl₂ [50mM] en la primera i la segona PCR respectivament i finalment amb aigua destil·lada fins al volum final. El protocol d'amplificació va ser el següent: 95°C durant 7 minuts, després d'una desnaturalització a 95°C durant 30 segons; 30 segons d'annealing a la temperatura òptima del *primer* (Taula 3) i una extensió a 72°C durant 30 segons durant 20 cicles, seguit d'una extensió de 15 minuts finals per a les dues etapes de PCR. El protocol d'amplificació de la primera PCR es va dur a terme a partir 1µl DNA mostral bisulfitat. Del producte resultant es van utilitzar 1µl del producte per a la segona etapa de reacció o segona PCR amb 35 cicles de reacció. Afegir que tots els experiments es van repetir per triplicat. Els productes obtinguts es van visualitzar en gels d'agarosa al 2% amb BrEt.

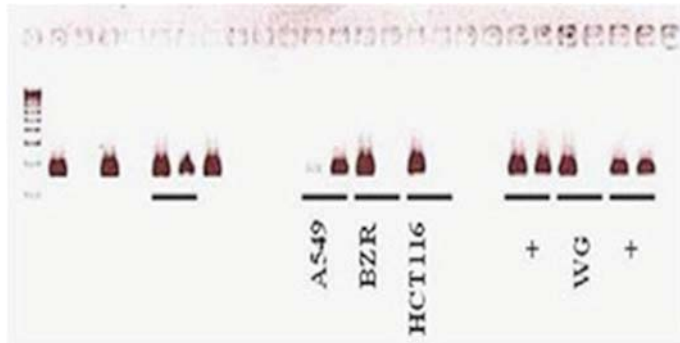


Figura 19. Exemple de MSP per al gen *TMS1*. Bandes de DNA obtingudes al córrer en paral·lel les dues condicions de metilació del producte obtingut d'un MSP per al gen *TMS1*.

5.3.2.1.2. Disseny *primers*

Per determinar l'estat de metilació de la regió promotora per via de l'MSP, es van emprar *primers* ja reportats per a l'ús de la tècnica. L'aproximació es va realitzar per PCR anellada i facilitar l'amplificació del DNA. El disseny es va fer amb la premissa que cada *primer* tingués com a mínim 3 citosines no metilades per evitar la interferència d'una conversió incompleta amb bisulfit [147] per minimitzar els possibles falsos positius. Donada aquesta primera etapa selectiva de la tècnica cap als fragments de DNA transformats correctament, anomenarem aquesta primera etapa de l'aproximació com a bisulfit específica (BS o Bisulphite conversion-specific).

Taula 3. Seqüència de primers per a l'assaig MSP:

| Gen | Primer | Amplicó (bp) | Línia cel·lular | T _a Annealing |
|----------------|--------|--------------------------|-----------------|--------------------------|
| TMS1 | | | HCT116 | |
| BS | | | | |
| | BS-F | GTTTTTGTGGAGGGTAA | 338 | 55 |
| | BS-R | TCCAAATAAAAATAACCAACTT | | |
| MSP | | | | |
| U | U-F | GGTTGTAGTGGGGTGAGTGGT | 196 | 60 |
| | U-R | CAAAACATCCATAAAACAACAACA | | |
| M | M-F | TTGTAGCGGGGTGAGCGGC | 191 | 60 |
| | M-R | AACGTCCATAAAACAACAACGCG | | |
| RASSF1A | | | A549 | |
| BS | | | | |
| | BS-F | TTTAGAGGTTGGGTGGG | 260 | 61 |
| | BS-R | ACCATCTCTCTACAAACCCATAT | | |
| MSP | | | | |
| U | U-F | GTTTTTGTGGAGGGTAA | 125 | 58 |
| | U-R | TCCAAATAAAAATAACCAACTT | | |
| M | M-F | GTTTTTGTGGAGGGTAA | 126 | 58 |
| | M-R | AACGTCCATAAAACAACAACGCG | | |
| APC | | | HCT116 | |
| BS | | | | |
| | BS-F | GGTTAGGGTTAGGTAGGTG | 350 | 64 |
| | BS-R | CTACCAATACAACCAC | | |
| MSP | | | | |
| U | U-F | GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGT | 108 | 60 |
| | U-R | CCAATCAACAACTCCCAACAA | | |
| M | M-F | TATTGCGGAGTGCGGGC | 98 | 60 |
| | M-R | TCGACGAACCTCCGACGA | | |

5.3.2.2. Melting Curve Assay (MCA)

Per mitjà d'aquesta tècnica es van avaluar les mateixes regions dels GST que per mitjà de l'MSP, ja que la MCA consta d'una única amplificació per PCR amb primers que tenen la mateixa seqüència Bisulfit Específica que el MSP.

5.3.2.2.1. Condicions

Un cop acabada la reacció de transformació amb bisulfit, utilitzem com en el cas de l'MSP 1µl de mostra de cara realitzar el MCA per mitjà d'un LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Roche AG Centre d'instruments, Rotkreuz, Switzerland) amb l'agent fluorescent intercalant SYBR-Green. La reacció es va dur terme en 9µl de barreja de reacció amb una concentració final de *primers* [1mM]. El protocol d'amplificació va ser el següent: 95°C durant 10 minuts, després 40 cicles de 10 segons a 95°C, 20 segons a la temperatura especificada d'annealing (Taula 4), l'extensió a 72°C durant un temps d'acord amb la mida de l'amplicó per tal d'evitar productes no específics. La polimerasa incorporada en el tampó de reacció del SYBR-Green per al Lightcycler 2.0 incorpora 25 nucleòtids/segon permeten ajustar el temps d'elongació a la mida de l'amplicó i així evitar amplifícacions de productes inespecífics.

L'anàlisi de la corba de fusió (MCA) es va realitzar a 95°C durant 10 segons de desnaturalització amb un increment posterior de temperatura, partint de 65°C durant 1 minut per arribar als 95°C paulatinament amb un augment de 0,03°C/s i realitzant 20 adquisicions per °C. Les corbes de fusió de cada mostra es van transformar en els pics de fusió a través del càlcul de $-(df/dt)$ amb les quals les mostres de metilació desconeguda es van comparar amb els perfils de referència dels controls positius i negatius.

Els experiments es van repetir per triplicat en consonància al MSP.

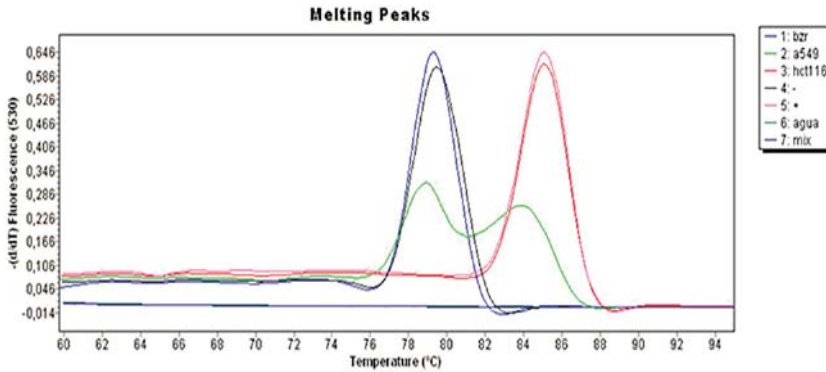


Figura 20. Exemple de LC per al gen *TMS1*. Pics de *melting* de DNA obtingudes realitzar una assaig LC per al mateix set de mostres de l'assaig per MSP de la Figura 19.

5.3.2.2.2. Disseny *primers*

Per a l'estudi per MCA és van utilitzar els *primers* dissenyats per a realitzar la PCR externa de l'MSP, de mode que l'estat de metilació de les regions analitzades fossin comparable entre ambdues tècniques.

5.3.2.3. Gradient de temperatures d'annealing.

Per tal d'optimitzar les temperatures d'annealing de les reaccions per als assajos de metilació, es van realitzar PCR simultànies amb els mateixos components de reacció però variant les condicions de temperatura a través del termociclador PTC-240 DNA Engine Tetrad[®]2 (MJ Research, Waltham, MA); fet que permetia elaborar un gradient de temperatures precís entre les 12 files del bloc tèrmic. Els productes obtinguts és van córrer en paral·lel en gels d'agarosa al 2% amb BrEt per tal de correlacionar el millor patró de banda amb la seva temperatura.

Taula 4. Primers utilitzats en l'anàlisi per MCA:

| Gen | Primer | Amplicó (bp) | Linia cel·lular | T _a Annealing |
|---------|--------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|
| TMS1 | | | HCT116 | |
| BS | | | | |
| | F GTTTTTGTTGGAGGGTAA | 338 | | 55 |
| | R TCCAATAAAAACTAACCAACTT | | | |
| RASSF1A | | | A549 | |
| BS | | | | |
| | F TTTAGAGGTTGGGTGGG | 260 | | 61 |
| | R ACCATCTCTACAACCCATAT | | | |
| APC | | | HCT116 | |
| BS | | | | |
| | F GGTTAGGGTTAGGTAGGTTG | 350 | | 64 |
| | R CTACACCAATACAACCAC | | | |

5.3.3. Caracterització de la Bisulfite Specific-Melting Curve Analysis (BS-MCA)

En base als resultats obtinguts en la comparació dels dos mètodes de PCR, MSP i MCA, es va decidir implementar l'estudi per MCA. Per altra banda donat l'important volum mostrat i per evitar l'anàlisi en diferents tandes que podrien produir divergència a l'hora de analitzar els resultats, es va decidir escalar l'estudi per MCA del Lightcycler 2.0 al Lightcycler 480 II. Aquest canvi de maquinari permetrà una major resolució i treballar amb un volum de 384 mostres simultàniament.

Tanmateix amb la intenció d'apropar l'avaluació de la metilació per MCA a la pràctica clínica amb uns canons d'eficàcia i seguretat es va realitzar experiments per tal d'establir el grau de sensibilitat i especificitat analítica, en els quals es va utilitzar l'anàlisi del gen *TMS1* com a referència i model per al desenvolupament de les aproximacions experimentals posteriors. Es

van utilitzar el DNA bisulfitat dels 20 teixits tumorals de diverses histologies i estadiatges de CP amb el seu teixit no tumoral, anteriorment utilitzats en la comparativa amb l'MSP, per a les quals es van dissenyar i testar els *primers* per avaluar la metilació dels gens de *TMS1*, *IGFBP3*, *RASSF1A* i *CDH13*.

5.3.3.1. Disseny de *primers*

BS-MCA es compon de dues etapes d'amplificació de PCR després de la modificació per bisulfit del DNA. En les dues rondes els *primers* amplifiquen específicament per seqüències amb una correcta conversió de bisulfit (BS). Aquesta tipologia de *primer* que no conté cap CpG també s'anomenen MIPs, de l'acrònim en anglès de *primers* independents de la metilació, fet que difereix clarament al disseny de l'MSP.

Tots els *primers* s'han dissenyat complint els següents criteris:

1. Els dos parells de *primers* implicats en les dos etapes, la PCR externa i la PCR corresponent al MCA, en ambdós casos els *primers* s'uneixen a diverses citosines que no pertanyen a dinucleòtids CpG per tal d'amplificar específicament les seqüències completament modificades amb bisulfit (com a mínim quatre citosines no-CpG al combinar el *primers* directes i inversos).
2. No es va incloure cap CpG en la seqüència dels *primers*.
3. Quan no existeix la possibilitat d'evitar un dinucleòtid CpG per qüestions de la seqüència, com va succeir amb

5.3.3.2. Condicions

La primera etapa d'amplificació o PCR externa, constava de la següent barreja de reacció: 1.5µl del buffer d'assaig 10x de la casa Bioline, 1.5µl de dNTPs [2 mM], 0.04µl de *primers* externs [2mM], 0.06µl de la Taq Immolase™ (Bioline, London, UK) [5u/µl] i 0.65µl de MgCl₂ [50mM]. El protocol d'amplificació constava de les següents etapes: una desnaturalització a 95°C durant 7 minuts, seguida de 20 cicles de replicació de 95°C durant 30 segons, 30 segons a la temperatura especificada d'annealing (Taula 5) i una extensió a 72°C durant 30 segons, seguit d'una extensió de 15 minuts finals. La reacció de la PCR anellada, també anomenada PCR interna, es va realitzar en un LightCycler 480 II (LC480 II) (Roche Diagnostics, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz, Switzerland) utilitzant 1µL de la PCR inicial en 9µl de LightCycler 480 SYBR-Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) amb una concentració final de *primers* de [1mM]. El protocol d'amplificació va ser el següent: 10 minuts a 95°C, seguit de 40 cicles de 10 segons a 95°C, 20 segons a la temperatura específica d'annealing (Taula 5) i finalment una extensió a 72°C durant un període de temps d'acord amb la mida de l'amplicó per prevenir productes inespecífics. Per al BS-MCA de *IGFBP3* es va afegir un 1% del volum de DMSO.

L'anàlisi de la corba de fusió (MCA) es va realitzar a 95°C durant 10 segons de desnaturalització amb un increment posterior de temperatura, partint de 65°C durant 1 minut per arribar als 95°C paulatinament amb un augment de 0,03°C/s i realitzant 20 adquisicions per °C. Les corbes de fusió de cada mostra es van transformar en els pics de fusió a través del càlcul de $-(df/dt)$ amb els

quals les mostres de metilació desconeguda es van comparar amb els perfils de referència dels controls positius i negatius.

5.3.3.3. Caracterització de la sensibilitat analítica

5.3.3.3.1. Gradient de dilucions.

Per realitzar l'estimació de la sensibilitat analítica de l'assaig i el grau de biaix que pogués experimentar la PCR, es van realitzar una sèrie de dilucions de DNA metilat en DNA no metilat. Els percentatges de DNA metilat en aquestes mostres reconstituïdes van ser del 0%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4%, 25%, 50%, 75% i 100% [148]. És important destacar que a l'hora de realitzar les dilucions dels DNAs, aquestes es van realitzar prèviament al tractament amb bisulfit de manera que qualsevol factor associat a la conversió afectés per igual als dos pools de DNAs. Posteriorment és va destinar 1µg de cada dilució per realitzar el tractament amb bisulfit sòdic, de la mateixa manera que les mostres de DNA provinents de teixit i les línies cel·lulars.

L'assaig es va optimitzat per a cada gen analitzat utilitzant una dilució (1:1) entre al·lels metilats i no metilats, la corresponent al 50% del gradient, avaluant així la intensitat relativa obtinguda en l'assaig entre l'al·lel metilat i no metilat fins arribar a obtenir una amplificació imparcial dels dos al·lels.

5.3.3.3.2. Assaig de clons

La proporció de residus metilats i no metilats en mostres reconstituïdes (0% , 6% , 25% i 100% dels al·lels metilats) va ser confirmada per un assaig de clonació amb les amplificacions obtingudes per el BS-MCA del gen *TMS1* de la bateria de mostres reconstituïdes. Per a tal fet, es va utilitzar la tecnologia de clonatge Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, Califòrnia, EUA) d'acord amb els protocols del fabricant. Aquest és un sistema de clonació per recombinació mediat per una BP ligasa. Per evitar problemes amb l'ús del fluorescent, en aquest cas SYBR-Green I, degut al seu efecte intercalant, en comptes de dur a terme l'amplificació amb el LC480 II, aquesta es va realitzar en un termociclador GeneAmp 7900 (Applied Biosystems).

Els passos per dur a terme la clonació van ser els següents.

1. Obtenció del producte d'amplificació de l'anàlisi de *TMS1* per BS-MCA duent a terme totes les amplificacions de PCR en termocicladors convencionals.
2. Amb 3µl de la PCR resultant es van realitzar adquisicions per corba de fusió per tal de contrastar que els patrons de les mostres obtingudes eren iguals que al realitzar el BS-MCA estrictament.

3. Es va reamplificar l'amplicó resultant de *TMS1* a partir d'1µl del producte mitjançant un nou parell de *primers* idèntics on s'ha afegit la seqüència flanquejant attB (Figura 22) produint que el producte resultant es vegi incrementat en 60pb. Aquesta permetrà la recombinació pDONR201 mediada per la BP ligasa amb la seqüència **attP** del vector. Es van utilitzar condicions de PCR estàndard a la mateixa temperatura d'*annealing*.



Figura 22. Seqüències flanquejants d'attB. Sèrie nucleotídica per a les seqüències flanquejants de attB1 i attB2 incorporades al *primers* de *TMS1* per tal de permetre la lligació.

4. El producte es va transfectar en cèl·lules TOPO TOP-10 per xoc tèrmic que posteriorment es van sembrar en plaques d'LB amb Kanamicina, que era l'antibiòtic al qual conferia resistència el vector.
5. Dels clons crescuts es van seleccionar colònies per tal de realitzar un creixement en medi LB durant 1,5h a 37°C en plaques de 96 pous. D'aquestes, 64 mostres de clons corresponien a la dilució del 6% d'al·lels metilats; 16 per al 25% ; i 7 clons per ambdós controls, el metilat al 100% i el no metilat. La finalitat era poder realitzar una

PCR d'screening amb les condicions estàndards a partir de 0,5µl del medi, utilitzant els *primers* de BS-*TMSI*. D'aquesta manera demostràvem l'eficiència de transfecció i localitzàvem les colònies que presentaven l'insert de *TMSI*.

6. Posteriorment 3µl del producte de la PCR d'screening es va barrejar amb 2µl de SYBR-Green per tal de realitzar un anàlisi d'adquisicions per corba de fusió i comprovar els patrons de metilació i detectar la presència de l'al·lel metilat en cada clon. D'aquesta manera esperàvem trobar el nombre de clons metilats corresponent al percentatge de la seva dilució.
7. Els resultats es van confirmar per seqüenciació.

Amb aquesta aproximació experimental es podria confirmar l'abast de la sensibilitat analítica real de la tècnica i la correlació amb la naturalesa dels productes analitzats prèviament i després de l'anàlisi.

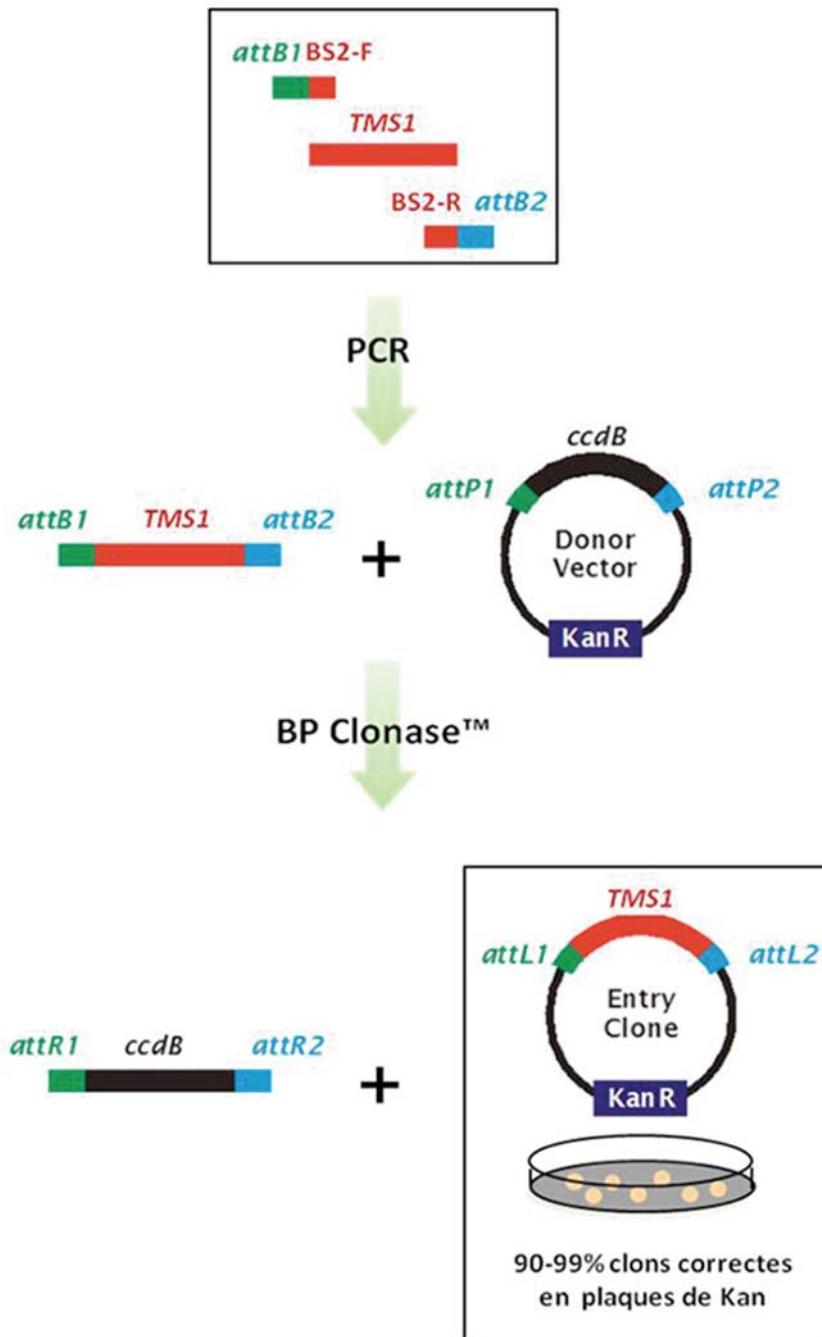


Figura 23. Representació gràfica per al protocols del sistema Gateway®.

5.3.3.4. Caracterització de l'especificitat

Per tal de confirmar que el DNA amplificat de les mostres corresponia a DNA totalment transformat amb bisulfit i que no havíem amplificat falsos positius, es va dissenyar un assaig per enzim de restricció per a la conversió específica de bisulfit, BCORA de les sigles en anglès.

5.3.3.4.1. BCORA

Aquesta tècnica es basa en la digestió del DNA amb un enzim de restricció que es dirigeix específicament a les seqüències que han estat completament convertides. WatCut, una eina on-line per a anàlisis de restricció, la qual ens va permetre identificar dianes per a enzims de restricció per a l'amplicó de *TMSI* de 338pb que diferissin entre els tres estats del DNA, el genòmic sense transformar amb bisulfit, el transformat amb bisulfit metilat i el transformat no metilat. Es va identificar i seleccionar una seqüència diana CGWCG[^] per a l'enzim de restricció Hpy99I. Aquesta diana es trobava a 172pb en la seqüència salvatge genòmica, aquesta es perdia i sorgia a canvi una altra en la transformació amb bisulfit de la seqüència metilada a 205pb. En conseqüència, l'absència d'aquest lloc de tall representa en l'al·lel no metilat que ha de quedar intacta després de la incubació amb l'enzim Hpy99I. Els patrons de digestió de l'amplicó de *TMSI* (338pb) diferirien tant per la presència de metilació, com pel grau de conversió del bisulfit sòdic. Mitjançant aquest disseny experimental s'esperava que sempre que el DNA d'al·lells no metilats estigués totalment transformats amb el bisulfit no veuríem cap tall per actuació de l'enzim; en canvi, el DNA d'al·lells

metilats totalment convertits estaria representat per dos bandes una de 205pb (corresponent a la localització de la diana de restricció) i una de 133pb. Ambdues bandes producte del mateix tall (205pb+133pb=338pb). I per finalitzar, el DNA no transformat s'identificaria pel patró de dues bandes a 172pb (corresponent a la localització de la diana de restricció) i 166pb. Aquestes dues també productes del mateix tall però que donada la seva proximitat possiblement es podrien veure com a un sol patró de banda amb en la resolució del gel d'agarosa al 2% . El patró teòric es resumeix en la figura (Figura 24) següent.

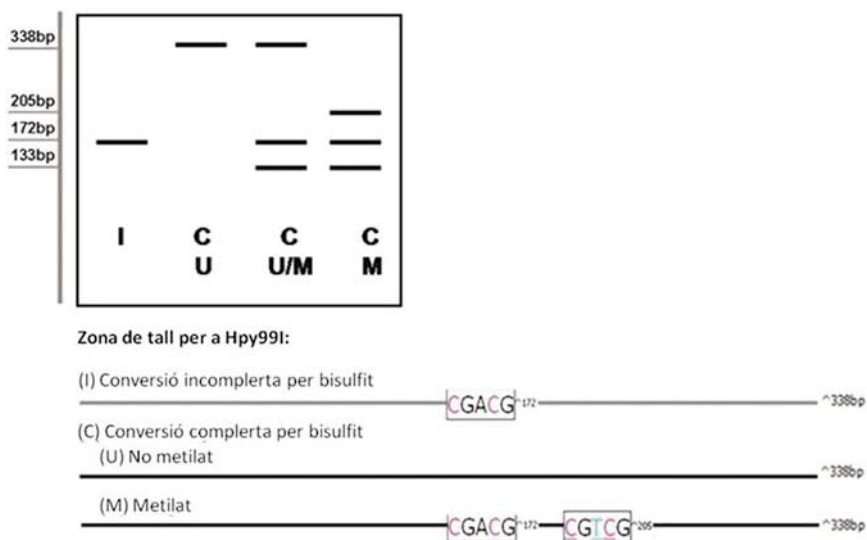


Figura 24. Seqüències diana per a Hpy99I. Seqüència i localització de la diana de tall en l'amplicó de *TMS1* segons el seu estat de metilació i conversió per bisulfit sòdic. Esquema representatiu del fragments de restricció esperat segons la casuística de tall en relació a l'estat de metilació del fragment i estat de conversió.

Aquesta incubació de digestió es va dur a terme durant 90 min a 37°C en un volum final de 25µl que contenia 0,5µl de l'amplicó de *TMSI* obtingut per BS-MCA i 3U de Hpy99I (New England Biolabs, Hannover, MD). Els productes de la digestió es van córrer en un gel d'agarosa al 2% amb BrEt.

5.3.3.4.2. Comparativa d'agents fluorescents intercalants

Es va realitzar una aproximació del BS-MCA en un termociclador convencional comparant els resultats obtinguts per al promotor de *TMSI* utilitzant els dos agents intercalants fluorescents comercials de Roche Diagnostics per al LC480 II, el SYBR-Green utilitzat en la nostra metodologia i el Resolight comercialitzat també com a HRM (sigles en anglès per a melting d'alta resolució) amb una capacitat superior de saturació al intercalar-se en el DNA en comparació amb el SYBR-Green.

Es va realitzar utilitzant 3µl del producte de PCR final barrejant-lo amb 2µl del corresponent agent fluorescent intercalant. Posteriorment es van analitzar el patrons dels pics de metilació per mitjà del mateix programa d'adquisicions que en el BS-MCA.

5.3.3.4.3. Correlació entre el nombre d'adquisicions en la corba de fusió i la resolució.

Es van realitzar diferent nombre d'adquisicions per increment de grau centígrad durant la realització de la corba de fusió amb els dos agents intercalants fluorescents. D'aquesta manera es volia

comprovar quin pes jugava el nombre d'adquisicions en la resolució de la tècnica.

5.3.4. Anàlisi d'un panell de marcadors en ADC per BS-MCA.

Una vegada establerts els paràmetres tècnics del BS-MCA es va procedir a analitzar l'estat de metilació d'un panell de GST i miRNAs.

5.3.4.1. Sèrie mostral

El següent estudi va estar compostat per 86 tumors primaris d'ADC pulmonar que comprenien tots els estadiatges de l'I al IV. Les característiques clinicopatològiques generals estan recollides en la Taula 6.

5.3.4.2. Marcadors analitzats

Es van analitzar 6 GST relacionats amb un pitjor evolució del CP descrits en anteriors estudis com són *APC*, *CDH13*, *IGFBP3*, p16, *RASSF1A* i *TMS1*. Conjuntament es van analitzar 2 miRNAs amb activitat supressora tumoral de la invasió i la disseminació com miRNA-148a i miRNA-34b/c.

Taula 6. Carecterístiques clinicopatològiques de la sèrie mostral analitzada:

| Característiques Clinicopatològiques | Mostres de pacients (n=86) |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Edat-anys | |
| Mitjana | 60.5 |
| Interquartile range | 13 |
| Sexe –no.(%) | |
| Home | 68 (79%) |
| Dona | 18 (21%) |
| Condicció de fumador –no.(%) | |
| Fumador actualment | 40 (46,5%) |
| Exfumador | 28 (32,5%) |
| No fumador | 14 (16,5%) |
| Desconegut | 4 (4,5) |
| Estadi 7è UICC –no.(%) | |
| IA (T1aN0 & T1bN0) | 12 (14%) |
| IB (T2aN0) | 27 (31,4%) |
| IIA (T2aN1 & T2bN0) | 3 (3,5%) |
| IIB T2bN1 o T3N0) | 16 (18,6%) |
| IIIA (T1N2, T2N2 o T3N2) | 15 (17,5%) |
| IIIB (T4N2 o T4N3) | 10 (11,5%) |
| IV (TxNxM1) | 3 (3,5%) |

5.3.4.3. Disseny de *primers*

En aquest estudi es van utilitzar els *primers* ja utilitzats en la caracterització de la tècnica BS-MCA, *TMSI* base de la caracterització; *CDH13*, *IGFBP3* i *RASSF1A*. Alhora es van dissenyar i testar *primers* amb les mateixes premisses descrites en l'apartat anterior 3.2.3 per als gens *TMSI*, *RASSF1A*, *APC*, *CDH13*, *IGFBP3*, p16, miRNA-148a i miRNA-34b/c. La seqüència dels *primers* es mostren en la següent taula (Taula 7).

Taula 7. Seqüència de primers corresponent al panell de marcadors seleccionats per a l'anàlisi:

| Gen | Primer | Amplicó (bp) | Línia cel·lular | T ₂ Annealing | No CpG/ CpG | Sensibilitat |
|-------------------------------|-------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-------------|--------------|
| TMS1 | | | HCT116 | | | |
| Externa | | | | | | |
| B51-F | TTTAGAGGTTGGGTGGG | 443 | | | 4/0 | |
| B51-R | ACCATCTCTACAAACCCATAT | | | | 5/0 | |
| Interna | | | | 36 | | 0.8% |
| B52-F | GTITTTTGTGGAGGGTAA | 338 | | | 4/0 | |
| B52-R | TCCAAATAAAAACTAACCAACTT | | | | 6/0 | |
| Interna Modificada (M) | | | | 35 | | 0.8% |
| B52-F | GTITTTTGTGGAGGGTAA | 330 | | | 4/0 | |
| nonB52-R | AACGTCCATAAAACAACCGCG | | | | 6/3 | |
| RASSF1A | | | A549 | | | |
| Externa | | | | | | |
| B51-F | GGAGGGAGGAAAGGTAAGG | 532 | | | 1/0 | |
| B51-R | TACCCCTAACCTACCCCTTC | | | | 4/0 | |
| Interna | | | | 16 | | 0.8% |
| B52-F | AGTTTGTATAGTTTATG | 191 | | | 8/0 | |
| B52-R | AACTCAATAAACTCAAACCTCCC | | | | 5/0 | |
| CDH13 | | | HCT116 | | | |
| Externa | | | | | | |
| B51-F | TTTTGGAAAAATGGAATAGI | 681 | | | 4/0 | |
| B51-R | ACTAAAAACTCTCTCTCTCC | | | | 4/0 | |
| Interna | | | | 13 | | 0.8% |
| B52-F | TGGGAAATGATGGTIG | 185 | | | 2/0 | |
| B52-R | ACAACCCCTCTCTCTACT | | | | 2/0 | |

(continua pàgina següent)

5.3.4.4. Condicions

La primera etapa d'amplificació o PCR externa constava de la següent barreja de reacció: 1.5µl del buffer de reacció 10x de la casa Bioline, 1.5µl de dNTPs [2 mM], 0.04µl de *primers* externs [2mM], 0.06µl de la Taq Immolase™ (Bioline, London, UK) [5u/µl] i 0.65µl de MgCl₂ [50mM]. El protocol d'amplificació constava de les següents etapes: una desnaturalització a 95°C durant 7 minuts, posteriorment el cicle de replicació consta de 95°C durant 30 segons, 30 segons a la temperatura especificada d'annealing (Taula 7) i una extensió a 72°C durant 30 segons durant 20 cicles seguit d'una extensió de 15 minuts finals. La reacció de la PCR anellada, també anomenada PCR interna, es va realitzar en un Lightcycler 480 II (LC480 II) (Roche Diagnostics, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz, Switzerland) utilitzant 1µL de la PCR inicial en 9µl de la Lightcycler 480 SYBR-Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) amb una concentració final de *primers* a [1mM]. El protocol d'amplificació va ser el següent: 10 minuts a 95°C, seguidament 40 cicles de 10 segons a 95°C, 20 segons a la temperatura específica d'annealing (Taula 5) i finalment una extensió a 72°C durant un període de temps d'acord amb la mida de l'amplicó per prevenir productes inespecífics. Per al BS-MCA de *IGFBP3* es va afegir un 1% del volum de DMSO. L'anàlisi de la corba de fusió (MCA) es va realitzar a 95°C durant 10 segons de desnaturalització amb un increment posterior de temperatura, partint de 65°C durant 1 minut per arribar als 95°C paulatinament amb un augment de 0,03°C/s i realitzant 20 adquisicions per °C. Les corbes de fusió de cada mostra es van transformar en els pics de fusió a través del càlcul de $-(df/dt)$ amb els quals les mostres de metilació

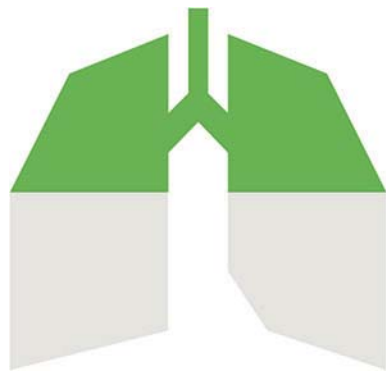
desconeguda es van comparar amb els perfils de referència dels controls positius i negatius.

5.3.4.5. Anàlisi estadístic

Per a l'anàlisi estadístic de les dades es va utilitzar el paquet estadístic SPSS (versió 13.0). En l'estudi de l'associació entre variables clíniques i moleculars s'ha determinat per mitjà del Chi quadrat, mentre que per comparar la supervivència entre diferents categories a les corbes Kaplan-Meier s'ha utilitzat el log-rank test.

A partir dels resultats obtinguts en el BS-MCA per a cada marcador es va procedir a realitzar una correlació amb les dades clinicopatològiques on posteriorment per mitjà d'un anàlisi estadístic univariant i multivariant per regressió de Cox es va calcular l'impacte en la supervivència global (5aSG) i la supervivència lliure de malaltia (5aSLM) als 5 anys.

L'anàlisi estadístic es va estructurar en 2 grups mostrals determinats per l'estadiatge de la malaltia. Un grup inicial que incloïa totes les mostres analitzades per a tots els estadis (I - IV) per tal determinar associacions en l'aparició dels marcadors durant l'evolució de la malaltia i el possible monitoratge; i un segon grup d'anàlisi per a estadis inicials (I i II) que identifiqués la possible associació com a marcadors pronòstic.



RESULTATS

AUGTTAAUUGUGATTTTAAUTGATAGAUATTTATTTUUAUUTTGATTUUUTTTAGT TAGTTGAGATGTTTUUUTGATGGGGG

RESULTATS

6.1. ESTUDI PLAMET

El conjunt d'aquests malalts no era possible inicialment analitzar els tumors ja que eren malalts amb estadis avançats no operables. Per tant, es va procedir a través de la realització en paral·lel tant de la determinació de l'estat de metilació dels GST en les mostres de sang perifèrica i esput del programa del ICOBIOBANC corresponents al CPCNP com a la prospecció de l'estat de metilació per als diferents miRNAs en línies cel·lulars de CP i posteriorment en mostra no invasiva, que en aquest cas es va decidir per la mostra corresponents al sèrums, malgrat no es va poder finalitzar amb la determinació del total de mostres.

6.1.1. Estudi preliminar de l'estat de metilació de gens supressors tumorals en mostres no invasives.

Aquesta etapa inicial es va desenvolupar durant una estància en el Laboratori d'Epigenètica del Càncer del CNIO sota la supervisió del Dr. Manel Esteller. Aquest laboratori era referent en la metodologia de l'anàlisi de l'estat de metilació d'un gran nombre de gens supressors de tumors i miRNAs. D'aquesta manera comptàvem amb l'utilitatge i experiència en l'anàlisi per MSP per donar suficient confiança en l'abordatge de les mostres no invasives sense tumor primari de referència. Un cop analitzades tot el conjunt de mostres no invasives del projecte corresponents a als esputs espontanis i plasmes, els resultats es presentaven amb una molt elevada heterogeneïtat i un notable nombre de positius de metilació en contrast amb la bibliografia (Machida et al.). Sumat a la dificultat de no poder contrastar amb l'estat de metilació de les mostres de

tumor primari i sumat a una no paritat entre la disposició dels esputs amb mostres de plasma i sèrum associat. Arrel d'aquesta problemàtica es va optar per analitzar de forma independent les mostres que oferien més proximitat a la localització del tumor primari i alhora partia amb major quantitat i qualitat de DNA en l'extracció de mostra, com és l'esput. Arrel dels resultats obtinguts, es presentava un problema que calia resoldre amb la comparació de la signatura de l'estat de metilació d'aquests gens supressors tumorals en el tumor primari associat. Tanmateix, en el període d'avaluació es van valorar les opinions dissidents sobre la idoneïtat de l'MSP com a tècnica de referència (gold standard) per a l'avaluació de l'estat de metilació de GST, sobretot per a l'abordatge clínic. Fet que va fer palesa la necessitat de revisar i considerar un nou enfocament de l'estudi i idoneïtat de valorar inicialment l'estat de metilació dels gens en el tumor primari i alhora discutir la utilització de l'MSP com a tècnica de referència del projecte en comparació amb altres tècniques com el MCA.

6.1.1.1. Esputs

Amb els resultats obtinguts de la resolució de l'estat de metilació es va analitzar la prevalença del panell d'interès per al conjunt de 41 esputs espontanis 37 pertanyien a pacients amb CPCNP (Taula 8), destacant la capacitat de detecció de mostra tumoral del 80% al determinar la presència de l'estat metilat dels gens *TMS1* i *CDHI* individualment o en combinació entre ells. Pel que fa al conjunt de mostres de pacients de CPCP es va trobar un nombre de metilats de *TMS1* (2/4), *CDHI* (3/4), *APC*(1/4) i *DAPK* (0/4).

de metilació d'aquest, previ a l'abordatge en mostra clínica. Per mitjà de *primers* específics per a les condicions de metilació, no metilat i metilat, es van tornar a analitzar les diverses línies cel·lular per MSP.

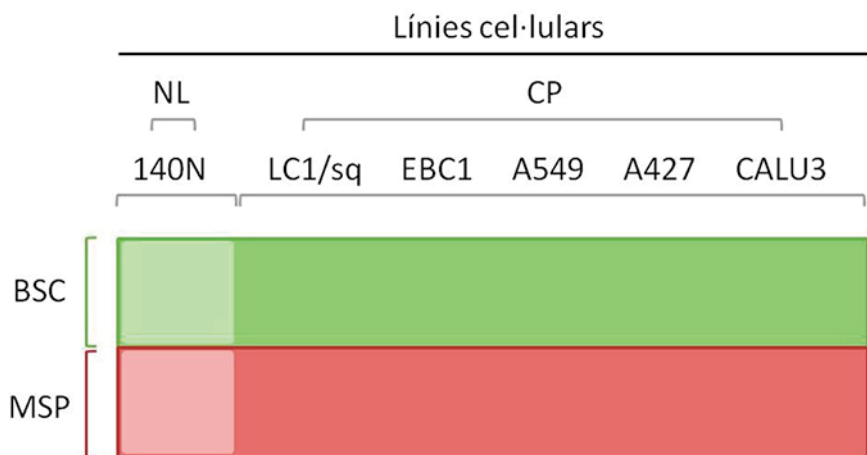


Figura 25. Resultats de l'estat de metilació de mir-124a1 en línia cel·lular. Es representa gràficament l'estat no metilat i metilat en color pàl·lid i fosc respectivament, determinat en les línies de CP i en comparació amb la mostra de línia no tumoral (NL) per ambdues tècniques d'anàlisi, la seqüència específica de bisulfit (BSC) i per MSP.

El resultat com es mostra en la Figura 25 confirmaven l'estat de metilació per a les línies de CP en contrast amb la línia no tumoral de teixit pulmonar fet que recolzava l'abordatge per a la determinació de l'estat de metilació en mostra clínica. No van existir discordances entre les dues tècniques, seqüenciació per a bisulfit i l'MSP.

6.1.2.1.2. Sèrums

Una vegada determinada l'eficiència de l'MSP en les línies cel·lulars es va voler determinar l'estat de metilació de mir-124a1 per a un petit nombre de mostres de sèrum. Es va seleccionar dels 60 DNAs extrets de sèrums de pacients amb CP un grup de 5 triats aleatòriament per a ser analitzats conjuntament amb un grup de 5 DNAs provinents de sèrums de persones sanes extrets ad hoc.

6.1.2.1.2.1. MSP

Els resultats obtinguts per mitjà de l'MSP presentaven dificultats d'interpretació al trobar el mateix nombre de mostres metilades en pacients afectes d'un CP (Figura 26) que en persones sanes, sèrums (2/7); controls (2/5); i bandes secundàries de productes inespecífics en les diferents repeticions de l'anàlisi realitzades, es va optar per posposar la continuació de l'estudi, com ja s'ha comentat en l'estudi de gens supressors de tumors per MSP en espus i plasmes per tal de buscar una tècnica de detecció de metilació més fiable.

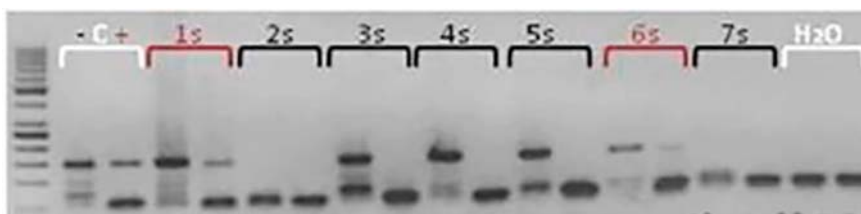


Figura 26. MSP de mir-124a1 en sèrum de pacients afectes de CP. Gel d'agarosa on es resolen els productes resultants de l'MSP per a mir-124a1 corregudes en carrils paral·lels per a cada mostra (segment delimitat) paral·lel ampliació d'estat no metilat i metilat respectivament. El sèrums analitzats (s) metilats i no metilats es troben representats en color vermell i negre respectivament.

6.2. COMPARATIVA MSP/MCA

L'elecció de la tècnica d'estudi es mostra com un factor rellevant i clau a l'hora de realitzar aproximacions metodològiques on la sensibilitat de la detecció i l'especificitat tenen un paper determinant; fent-se encara més palès, aquest fet, en l'estudi diagnòstic de malalties on, a més de la detecció qualitativa (presència o no), el terme quantitatiu pren rellevància. Per aquests motius es va comparar l'aproximació considerada en aquell moment d'elecció per a la determinació de l'estat de metilació en mostres biològiques, com era la MSP, envers la tècnica del MCA la qual permet la determinació de l'estat de metilació global de la seqüència i no únicament les CpGs determinades en els *primers* utilitzats. Tanmateix, el fet d'optar inicialment per l'ús del MCA es basava en les seves característiques *a priori*, d'elevada sensibilitat i determinació quantitativa alhora que ho podia oferir sense una despesa considerable de temps i recursos, ja que són factors rellevants per a una futura acceptació en l'abordatge de la pràctica clínica rutinària.

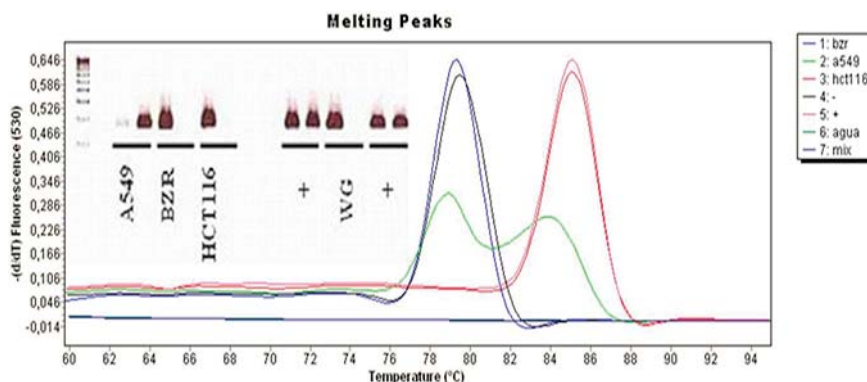


Figura 27. Comparació patrons de metilació per MSP i MCA de TMS1. Comparació dels patrons de metilació obtinguts per MSP resoltos en gels d'agarosa amb els obtinguts en forma de pic de *melting* amb la tècnica del MCA.

6.2.1. Anàlisi de 20 mostres aparellades tumor / no tumor

Per tal de determinar les diferències entre la MSP i el MCA vam analitzar 20 parells de mostres tumorals i el seu teixit normal aparellat corresponents a diferents histologies del CPCNP per a 3 gens on s'havia descrit hipermetilació del seu promotor. Aquestes mostres van ser analitzades prèviament pel Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge, assegurant un mínim del 50% de representació tumoral cel·lular. Els resultats es mostren a continuació per a cada marcador analitzat en les següents taules.

6.2.1.1. Estat de metilació del promotor gènic dels marcadors *TMSI*, *APC* i *RASSF1A* per MSP i MCA en 20 aparellats.

Veure resultats descrits a la taula següent (Taula 9)

Arrel dels resultats obtinguts vam poder confirmar per les dues tècniques d'anàlisi un índex de metilació superior en les mostres tumorals respecte les no tumorals, concordant amb la condició de metilació aberrant dels gens supressors de tumors en la carcinogènesi. Respecte els paràmetres tècnics vam poder extreure que la utilització del MCA per tal de discriminar les mostres metilades i no metilades ens proporcionava una major interpretabilitat i reproduïbilitat dels resultats malgrat una teòrica i relativa pèrdua de sensibilitat, a falta de la caracterització de la sensibilitat ja que, com s'ha comentat en la introducció en l'apartat de tècniques d'anàlisi de metilació, l'MSP es troba subjecte a un elevat nombre de falsos positius. Tanmateix, cal afegir que, en aquesta etapa de l'estudi no es va considerar necessària la comparació dels resultats obtinguts envers la seqüenciació després de bisulfit.

6.3. CARACTERITZACIÓ DE LA BS-MCA

Un cop escollida el MCA com la tècnica analítica per a l'anàlisi experimental i un cop establert i confirmat que el canvi de plataforma d'anàlisi pel MCA del Lightcycler 2.0 al Lightcycler 480 II no diferia en el resultats inicialment obtinguts; es va procedir a realitzar diversos experiments per tal de poder posar a punt l'anàlisi determinant la sensibilitat analítica, la especificitat i el rol determinant del disseny dels *primers*, emprant com a referència el promotor del gen *TMS1*.

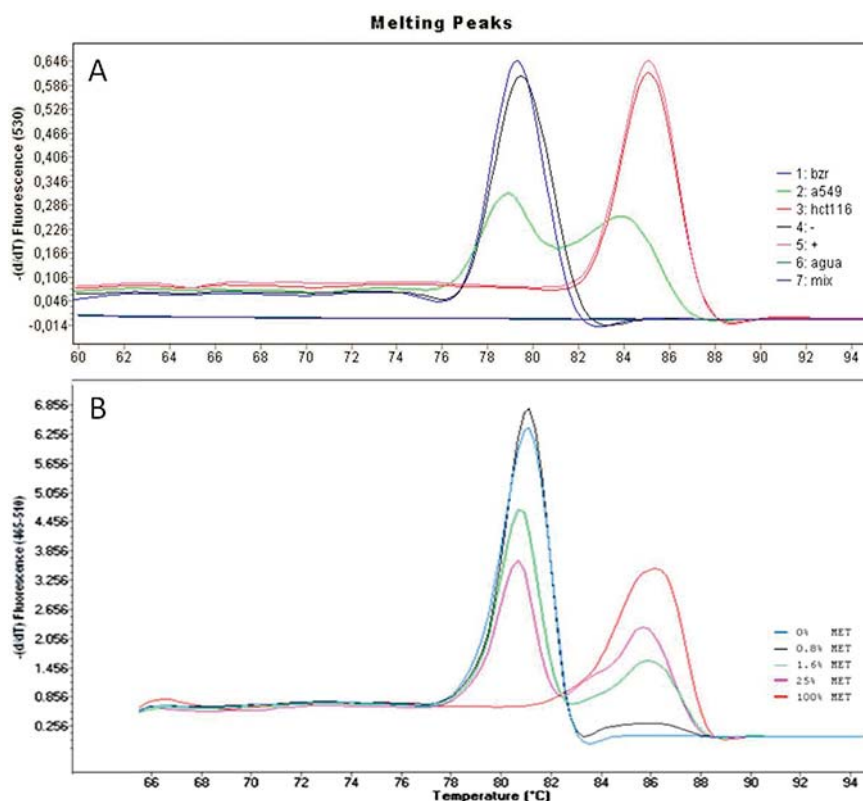


Figura 28. Comparació dels patrons dels pics de *melting* de *TMS1* entre LC 2.0 i LC 480 II. La figura presenta els pics de *melting* per l'anàlisi de l'estat de metilació de *TMS1* a través del Lightcycler 2.0 (A) i a través del Lightcycler 480 II (B). L'únic tret diferencial destacable a nivell tècnic és la intensitat superior detectada a través del LC 480 II.

6.3.1. Disseny de primers

Es seleccionà el promotor de *TMSI* per provar les variables que podrien afectar el rendiment del nostre assaig donat que la mida de l'amplicó determinat del promotor causaria diferències destacades entre les temperatures de fusió de les molècules metilades i les molècules no metilades. L'amplicó escollit per *TMSI* engloba més de 30 residus CpG. En primer terme, es va estudiar l'impacte relatiu sobre el biaix de PCR per la utilització dels primers dissenyats com a primers específics per a la conversió amb bisulfit (BS) i dels primers no específics per a la conversió amb bisulfit (nonBS) o específics per a la condició d'al·lel metilat. Aquests últims són els típicament utilitzats en l'MSP, els quals s'adrecen a un nombre limitat de CpGs i en aquest cas concret de *TMSI* el nombre corresponent era de 3 CpGs.

Al realitzar l'aproximació en un sol pas de PCR, l'ús de MIPs mostra un biaix inequívoc cap a l'estat no metilat com s'observa en la representació d'un pic a la zona corresponent a la temperatura corresponent a l'estat no metilat en analitzar la mostra reconstituïda amb el 100% d'al·lels metilats, control positiu del nostre assaig (Figura 29 quadrant BS2). Per altra banda l'ús de primers nonBS resulta en un biaix cap a l'estat de metilació com es demostra i representa el pic de la corba de fusió que es va obtenir en l'anàlisi del control negatiu de l'estat de metilació (DNA no metilat) dins el rang de temperatura del control positiu (DNA 100% metilat) (Figura 29 quadrant nonBS). Per tant, la inclusió de llocs CpG en la seqüència del primer pot amplificar les molècules no completament transformades per bisulfit sobreestimant el nivell de metilació.

A continuació, es va explorar si una PCR amb dos passos, PCR anellada, podria evitar els inconvenients observats en l'aproximació d'un sol pas. Utilitzant uns *primers* externs amb la condició de *primers* BS es va poder corregir completament el biaix cap a l'estat de no metilat durant el l'anàlisi de la corba de fusió (MCA). (Figura 29 quadrant BS1/BS2). No obstant això, l'enfocament per PCR anellada no va compensar totalment el biaix cap a l'estat de metilació per als *primers* nonBS, com es podia observar amb el petit pic obtingut del control negatiu en el rang de temperatures del control positiu de metilació (Figura 29 quadrant BS1/nonBS).

Arrel d'aquests resultats obtinguts vam poder determinar que l'ús de *primers* amb característiques BS en els dos passos de la PCR (PCR anellada), són clau per obtenir una determinació fiable de l'estat de metilació, amb un menor efecte resultant del biaix cap a la condició de metilació i permetent una detecció de l'al·lel metilat amb una alta sensibilitat (veure l'apartat següent) sense obstaculitzar l'especificitat.

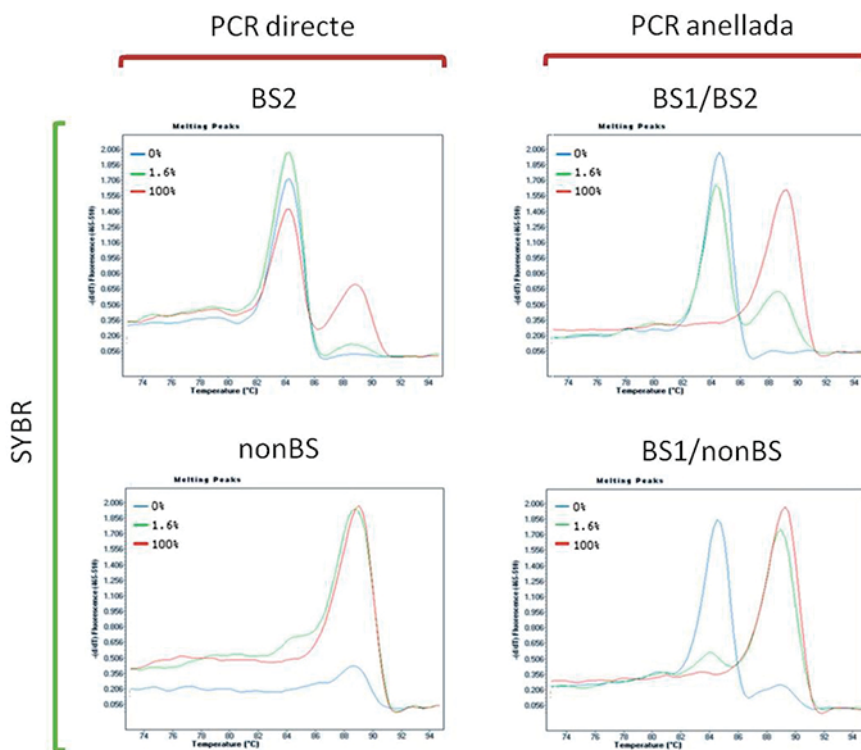


Figura 29. Comparativa de la utilització de primers MIPS i nonBS en l'anàlisi de *TMS1*. La figura presenta les diferències obtingudes amb la utilització de primers MIPS (BS1 i BS2) en comparació amb l'ús de primers nonBS, utilitzant en ambdós casos una aproximació per PCR directe i una per PCR anellada.

6.3.2. Sensibilitat analítica

Per tal d'establir la sensibilitat analítica i poder caracteritzar així el llindar de metilació detectat, es va procedir a la determinació d'aquest a través d'un gradient de dilucions. Posteriorment i en base als resultats obtinguts es va poder confirmar la veracitat d'aquesta detecció per mitjà de clonacions i posterior confirmació per seqüenciació dels clons transfectats.

6.3.2.1. Gradient de dilucions

Els experiments es van realitzar utilitzant una sèrie de dilucions progressives d'al·lels metilats en mostres no metilades que inclouen el 100% , 25% , 6% , 1,6% , 0,8% i 0% d'al·lels metilats. Aquest procediment es va realitzar per a *TMS1*, *CDH13*, *RASSF1A*, *IGFBP3* i els miRNAs miR-34b/c i miR-148a1 assolint finalment com a resultat final una detecció mínima del 0,8% per a tots el marcadors que formarien part del panell de marcadors de l'estudi.

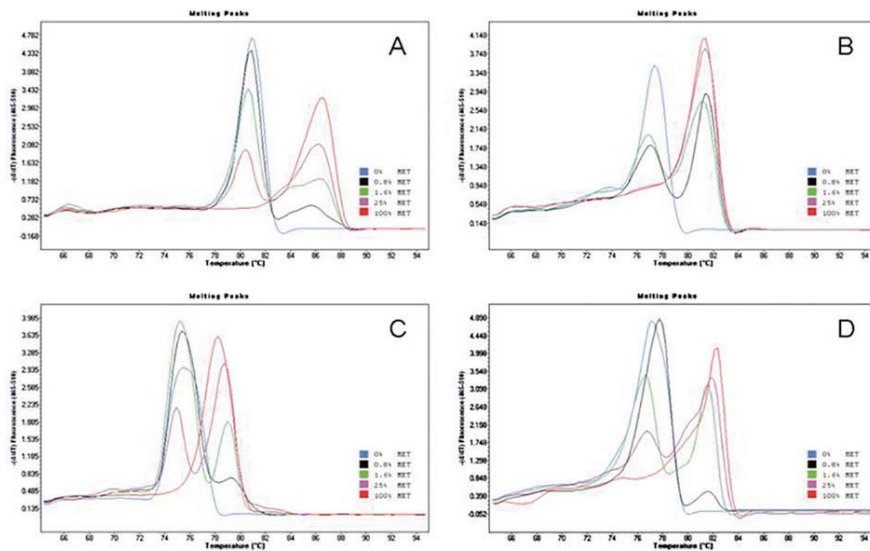


Figura 30. Determinació del grau de sensibilitat per al panell de biomarcadors. Es descriuen el nivell de sensibilitat assolit i el patró de pics de *melting* del gradient de DNA metilat per a *TMS1* (A), *CDH13* (B), *RASSF1A* (C) i *IGFBP3* (D).

6.3.2.2. Assaig de clons

Mitjançant l'assaig per clonació dels productes obtingut per BS-MCA del promotor de *TMSI* es pretenia resoldre dos interrogants, si el producte amplificat corresponia a la dilució analitzada amb el percentatge d'al·lèls metilats i no metilats, i per tant mitjançant el disseny de *primers* hauriem evitat el biaix de la PCR cap a qualsevol de les dues condicions; i per altra banda constatar que les seqüències amplificades eren efectivament no metilades o metilades segons la naturalesa de la mostra, identificant artefactes i/o falsos positius. Per mitjà d'aquesta aproximació experimental es van utilitzar totes les mostres reconstituïdes del gradient de metilació. Un cop obtingut els productes per l'amplificació de *TMSI* amb BS-MCA, aquests es van tornar a amplificar amb el *primers* modificats de *TMSI* que inclouen les seqüències attBs, necessàries per a la inserció en el vector donador de la BP clonasa, obtenint així els mateixos productes però amb un increment de 60pb.

Arrel d'aquests nous productes obtinguts corresponents al gradient de metilació es va procedir amb el procés de clonació amb la BP clonasa a través del kit comercial AllPrep DNA/RNA Micro Kit (QIAGEN Group) en cèl·lules competents per xoc tèrmic TOPO TOP-10. L'agent intercalant SYBR-Green interferia en el procés de clonació i per tant es va decidir eliminar-lo del procés realitzant una reamplificació del material en un termociclador convencional.

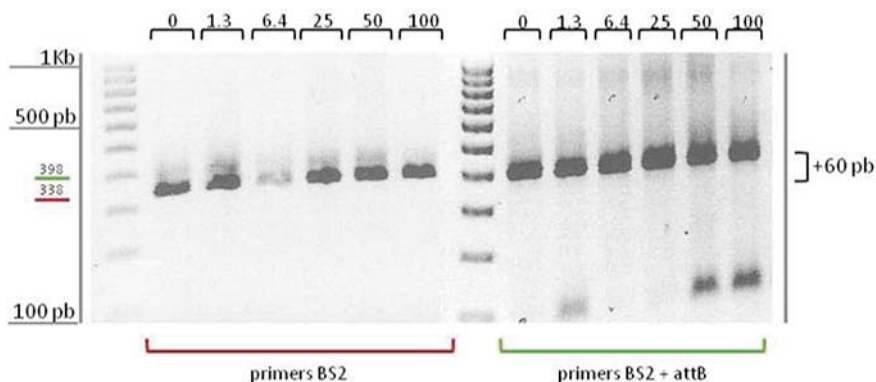


Figura 31. Incorporació de la seqüència attB necessària per a la clonació en l'amplicó de *TMS1*. Es presenta com el fragment amplificat de *TMS1* en l'anàlisi passa de 338pb a 398pb a conseqüència de la incorporació de les seqüències flanquejant d'attB.

A continuació es va decidir treballar amb les dilucions corresponents a 0% , 6.4% , 25% i 100% , essent el 0% i el 100% el control negatiu i positiu de la reacció. Es va optar per 6% i 25% de manera que l'abordatge experimental es confirmava en obtenir resultats positius amb un nombre relativament assequible de clons. D'aquesta manera es va decidir que l'abordatge experimental consistiria en la selecció de 7 clons per a la representació dels controls, 64 clons per a la mostra de 6% i 16 clons per a la mostra del 25% d'al·lels metilats. D'aquesta manera en detectar entre 3 i 4 clons metilats en les colònies de la mostra de 6% i trobar 4 en el cas del 25% , confirmariem com a reals el llindars de detecció de la tècnica del BS-MCA. Posteriorment per a l'avaluació dels clons es va realitzar una PCR d'screening emprant el *primers* de *TMS1* sobre els clons seleccionats per tal de comprovar si tenien o no l'insert i així posteriorment procedir a la identificació del seu estat de metilació.

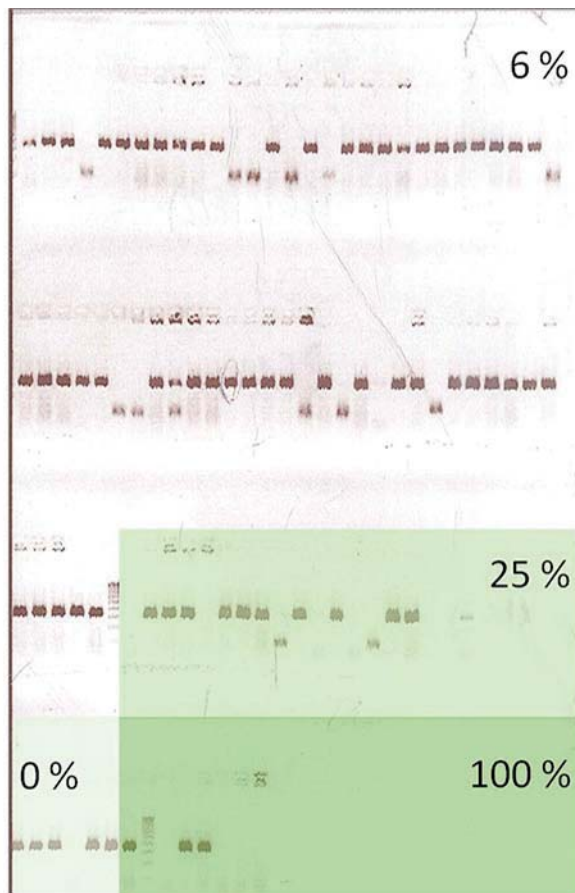


Figura 32. PCR screening del clonatge de l'amplicó de TMS1. El patró de bandes en gel d'agarosa corresponents a 398pb demostren la incorporació de l'insert en els diferents clons seleccionats. Aquest es presenten agrupats per color en el gel segons l'origen en el gradient de dilucions de DNA metilat sent el 0% verd clar, el 6% blanc, 25% verd intermedi i el 100% metilat verd fosc.

En analitzar els resultats de la PCR d'screening es va evidenciar que el nombre de clons que la transfecció havia tingut una eficiència del 80% , obligant a variar el nombre de resultats positius necessaris per a la confirmació, com es presenta en la Taula 10. Cadascun dels clons va ser testat per mitjà de BS-MCA de *TMS1* podent confirmar el seu estat de metilació amb el seu origen del gradient de metilació fos 0, 6% , 25% o 100% metilat.. Un petit percentatge (11 mostres) van ser també seqüenciats obtenint una bona correlació entre BS-MCA i seqüenciació (Figura 33). Els resultats ens van indicar que les dilucions tenien el percentatge de metilació esperat (Taula 10).

Taula 10. Resultats esperats i confirmació del clonatge de l'amplicó de *TMS1*:

| % MET | Clons esperats | PCR screening | Resultat esperat | Resultat confirmat |
|-------|----------------|---------------|------------------|--------------------|
| 6 | 64 | 53 | 3 | 3 |
| 25 | 16 | 10 | 2-3 | 2 |
| 0 | 7 | 6 | 0 | 0* |
| 100 | 7 | 3 | 3 | 1* |

* Amb la confirmació d'un cas amplificat és suficient per la condició de control negatiu i positiu

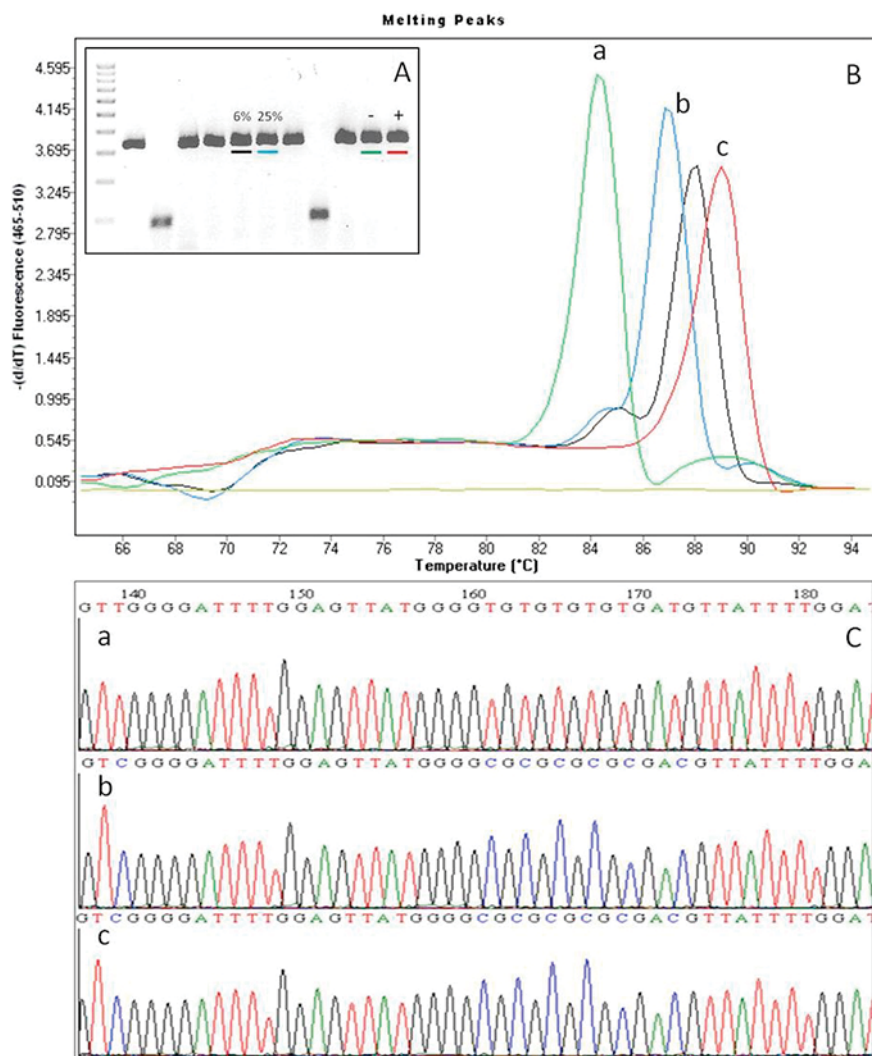


Figura 33. Seqüències de confirmació. A) Patró de bandes de les 11 seqüències seleccionades en la PCR d'*screening* representatives per a les diferents percentatges de metilació clonats, 5 clons del 6%, 4 del 25% i un clon per a cada control de metilació, el negatiu 0% i el positiu 100%. Per tal de contrastar la informació es van seleccionar dos clons sense insert. B) Patrons dels pics de *melting* corresponent a les mostres indicades (subratllat) relacionades amb el requadre A. Es fa palesa l'estat de metilació positiu tant pel 6% com per la mostra del 25%. C) Seqüències obtingudes de l'amplicó de *TMS1* metilat que correspon el seu patró de pic de *melting* amb el seu estat de metilació, (a) no metilat – 0%; (b) metilat – 6% i 25%; (c) metilat – 100%.

6.3.2.3. Nombre d'adquisicions durant el MCA.

Es va voler determinar si el nombre d' adq/°C que s'assolien durant la dissociació de la corba de fusió, definit en el programa del LC480 II, era significativament determinant per a la sensibilitat de la detecció dels al·lells metilats. Es van realitzar diferents MCA amb un nombre de 10, 15, 20, 25, 35 i 50 adquisicions per grau centígrad (adq/°C) per tal de comparar la seva detecció durant l'anàlisi del promotor de *TMSI*, sobre les mostres reconstituïdes d'al·lells metilats (Figura 34).

Els resultats obtinguts no ens mostraven diferències significatives a nivell de resolució del pic de fusió quan el nombre d'adq/°C durant la fusió es va augmentar de 10 adq/°C a 50 adq/°C. Finalment es va optar per realitzar 20 adq/°C com el nombre que permetria una solució de compromís amb una molt bona resolució, preveient el cas de promotors que donat el seu nombre de CpGs no existís una elevada diferència de °C entre la condició no metilada i metilada; i alhora que no allargava excessivament el temps de l'experiment innecessàriament.

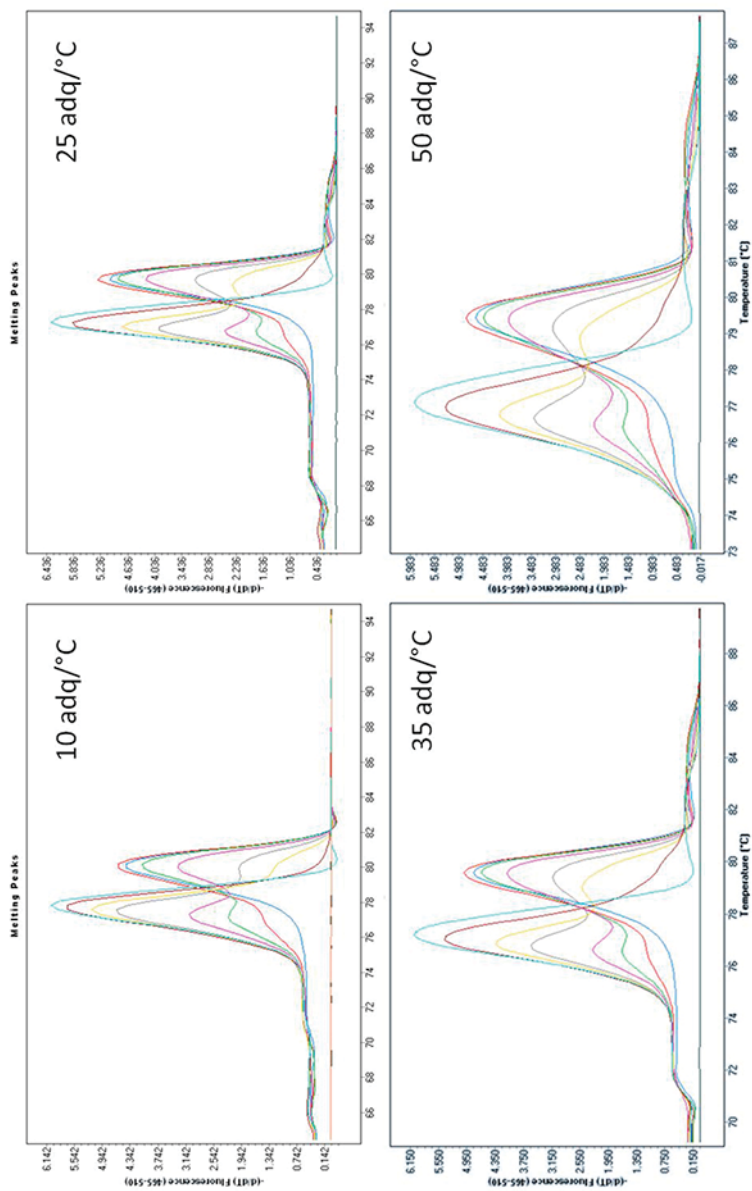


Figura 34. Determinació del nombre d'adq/°C.

6.3.3. Especificitat analítica

Per tal d'establir la especificitat analítica i poder caracteritzar que la tècnica emprada presenta els resultats de manera que la senyal obtinguda només es relacioni amb la presència o quantitat del DNA de naturalesa que volem determinar. Amb aquesta premissa es va realitzar un anàlisi per enzims de restricció específics per a la conversió completa amb bisulfit (BCORA) que revelava la naturalesa del DNA de la mostra. Al mateix temps vam voler determinar si la presència de components de la mostra, en aquest cas l'agent fluorescent intercalant, podien produir inespecificitat, induint a errors sistemàtics. D'aquesta manera es van realitzar la comparació de dos agents fluorescents intercalants per al LC480.

6.3.3.1. BCORA

Es va analitzar l'amplicó de *TMSI* obtingut amb mida de 338pb en l'anàlisi per BS-MCA arrel de les mostres amplificades del gradient de dilucions. La seqüència amplificada oferia una sèrie de dianes per a Hpy99I que ens permetia discernir i discriminar entre les diferents naturaleses del DNA (convertit/no convertit i mtilat/no metilat) que es poden donar durant l'anàlisi per BS-MCA. La digestió amb Hpy99I generava diferents productes en consonància amb el seu estat de metilació i conversió per bisulfit sòdic del DNA (Figura 35 Esquema). El DNA amb conversió incompleta restava amb una sola diana de tall a 172 bp (Figura 35 Esquema - I). La no presència de cap banda confirmava l'estat de no metilació i conversió total del DNA (Figura 35 Esquema - C/U). Per generació d'una diana de restricció a 205 bp específicament quan la naturalesa del DNA era metilada i de conversió

i una altra diana en estat aquesta no associada a conversió completa com era a 172bp obteníem tres productes de tall a 205bp, 172bp i 139bp. Aquesta última fruit de l'acció de la diana de 172bp sobre el fragment de 205bp (Figura 35 Esquema - C/M). La presència de 2 bandes de 172 i 139bp a totes les dilucions testades, excepte el control negatiu (Figura 35 Gel d'agarosa), així com la seva intensitat creixent, en funció del contingut de DNA metilat, confirma la presència de l'al·lel metilat. A destacar que la mostra totalment metilada té una part no digerida que atribuïm als temps curt de digestió així com a la quantitat total del DNA. D'aquesta manera amb aquest resultat podem afirmar que l'anàlisi de l'especificitat analítica no estava influïda per una possible conversió incompleta per bisulfit. Alhora confirmava que el DNA estava metilat o no seguint el mateix patró evidenciat per altres tècniques de detecció.

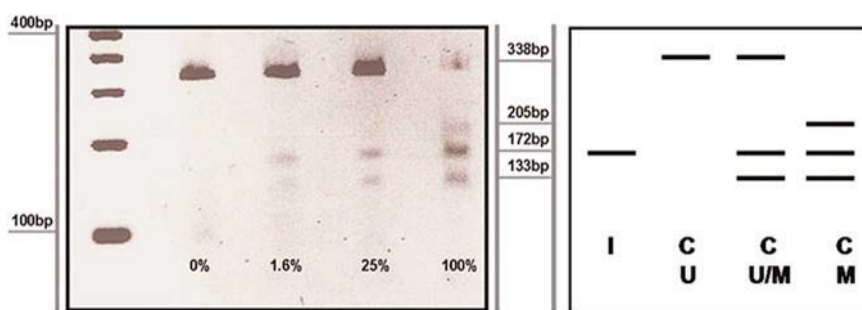


Figura 35. BCORA de TMS1 per l'enzim de restricció Hpy99I. Es mostra els patrons de banda en gel d'agarosa (gel d'agarosa - esquerra) obtinguts per acció de l'enzim Hpy99I sobre les dianes de l'amplicó de TMS1, confirmant el resultat esperat (esquema - dreta) per a les diferents naturaleses del DNA segons l'estat de conversió per bisulfit de incompleta (I) o completament (C); i segons l'estat de metilació del DNA, no metilat (U) i metilat (M).

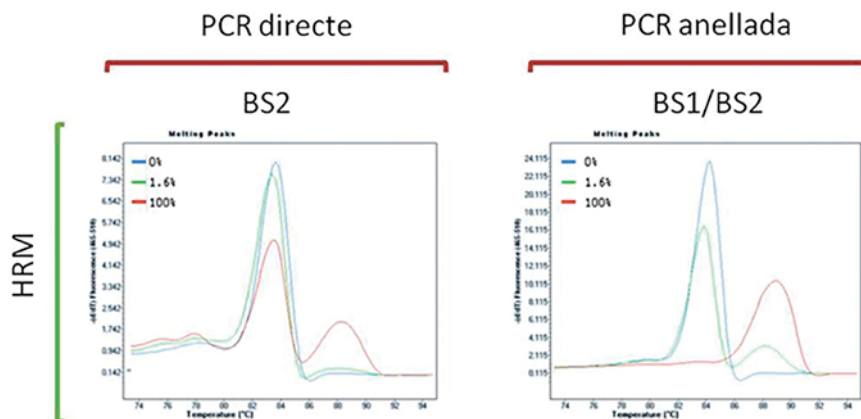


Figura 36. Utilització de l'agent intercalant fluorescent HRM. Es mostra els patrons de pics de *melting* per a les aproximacions per PCR directe (BS2) i per PCR anellada (BS1/BS2) utilitzant l'agent HRM en l'anàlisi de *TMS1* per mostres a seleccionades del gradient de dilucions de DNA.

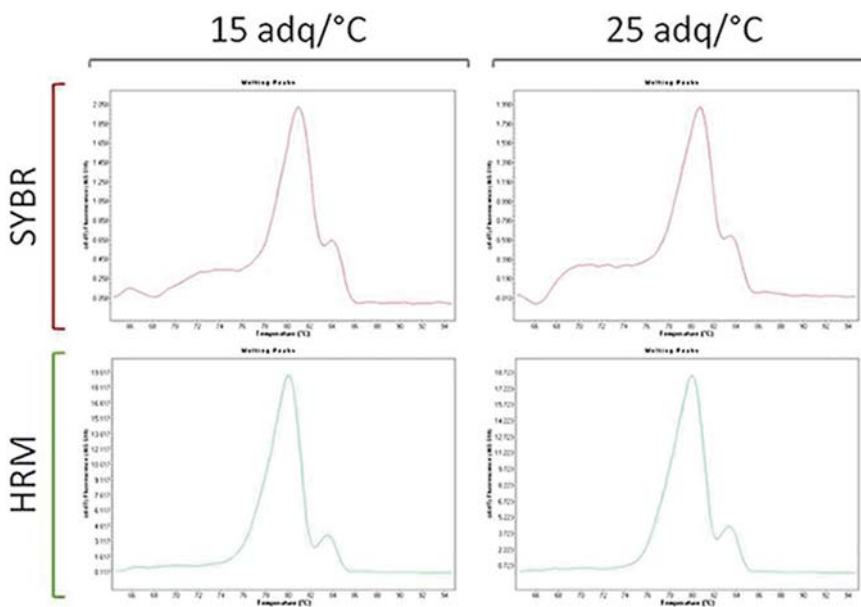


Figura 37. Comparació dels agents intercalants fluorescents. Es mostra els patrons dels pics de *melting* per la determinació de l'estat de metilació utilitzat com agent intercalant SYBR-Green (vermell) i HRM (verd). El patrons presenten una diferència destacada únicament a nivell d'intensitat de fluorescència però no a nivell del llindar detecció, ni tant sols incrementant el nombre d'adq/°C de 15 a 25.

6.4. ANÀLISIS D'UN PANELL DE BIOMARCADORS EN ADC

Un cop caracteritzat el procediment experimental a través del BS-MCA de *TMS1*, es va procedir a l'anàlisi dels promotors gènics d'*APC*, *RASSF1A*, *IGFBP3*, *CDH13*, miR-34b/c i miR-148a en biòpsies d'ADC. En aquesta caracterització es van utilitzar els gradients de mostres reconstituïdes i utilitzant com a control positiu per a cada marcador línies cel·lulars que havien estat prèviament analitzades. En tots el casos el BS-MCA va ser capaç de detectar el 0.8% d'al·lels metilats amb un 100% d'especificitat. Cal destacar que la inclusió de la modificació del *primers* amb Inosina en un dels *primers* d'IGBP3 no afectava a la sensibilitat, ja que aquesta va ser igual que la dels altres gens assajats.

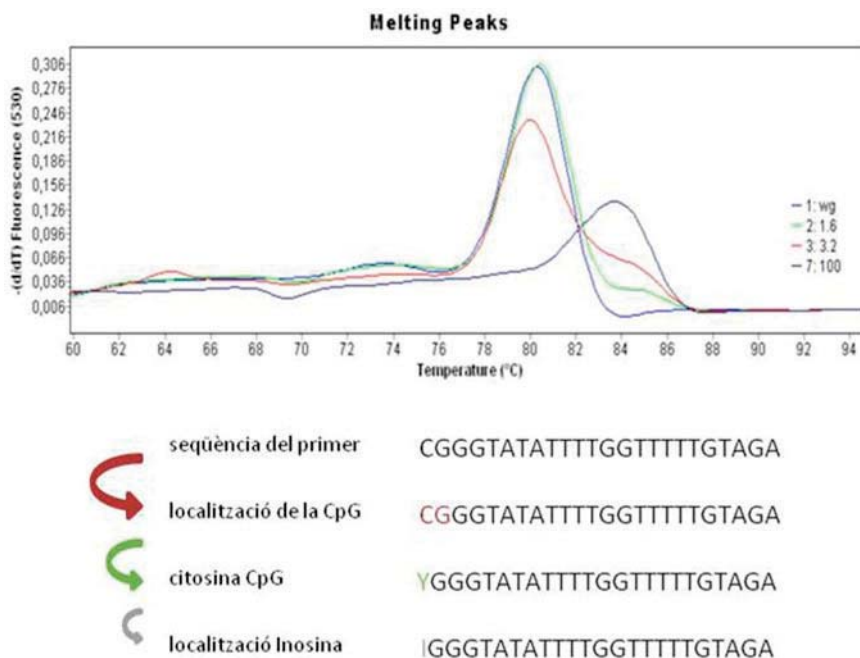


Figura 38. Demostració de l'ús i localització de la Inosina en els primers BS2 d'IGFBP3.

6.4.1. Especificitat de la metilació en el teixit tumoral.

La possible utilitat clínica d'aquest mètode per distingir mostres no neoplàsiques de pulmó de mostres de CP es va avaluar en un conjunt de 20 parells de biòpsies tumorals primàries i la seva mostra no tumoral aparellada de CPCNP. El marcadors analitzats amb el BS-MCA per aquest conjunt de mostres van ser *TMS1*, *RASSF1A*, *CDH13* i *IGFBP3*. En cada anàlisi es van incloure els controls positius i negatius de metilació juntament amb la mostra reconstituïda del 0.8% per tal de confirmar la sensibilitat analítica en cada assaig. La prevalença de l'estat de metilació va variar del 55% per a *CDH13* al 5% per a *TMS1* (Taula 11). Tanmateix només 2 dels parells de mostres van mostrar metilació pel promotor de *CDH13*.

Taula 11. Nombre de mostres metilades per a les mostres de teixit:

| | TMS1 | RASSF1A | CDH13 | IGFBP3 |
|------------|------|---------|-------|--------|
| No tumoral | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Tumoral | 1 | 7 | 11 | 3 |

6.4.2. Anàlisi d'un panell de marcadors en mostres d'ADC.

Es va determinar l'estat de metilació per a *TMS1*, *APC*, *RASSF1A*, *CDH13*, *IGFBP3*, miR-34b/c i miR-148a en una cohort de 86 ADC de diferents estadis, que comprenia del I-IV, procedents de cirurgies amb intenció radical a l'Hospital Universitari de Bellvitge. Aquesta cohort estava composta per mostres procedents de 68 homes i 18 dones, on la mediana d'edat era de 60.5 anys. L'exposició a l'hàbit tabàquic es corresponia amb 28 exfumadors, 39 fumadors, 14 no fumadors i 5 d'hàbit desconegut. La

distribució per estadis de CP corresponia al estadi I amb 39 mostres (12 Ia; 27 Ib); II 19 (IIa 3; IIb 16); 25 III (IIIa 15; IIIb 10); 3 IV. La mitjana de seguiment va ser de 6.21 anys amb el resultat de 32 vius, 35 morts (41%), 19 sense informació i unes dades de recurrència de 44 positius (51%), 33 sense recurrència (48%) i 9 sense dades (1%) en data de l'anàlisi.

La prevalença de metilació va ser elevada per a *CDH13* i *APC* amb un 63,6% i 61,5% respectivament i per contra una la parella formada per el marcadors p16 i *TMSI* van presentar una prevalença de metilació baixa, sobretot comparada amb la bibliografia existent, amb un 6,9% i un 5,1% respectivament. Els altres biomarcadors van presentar una prevalença destacada amb *IGFBP3* 25,3% , *RASSF1A* 30,8% i els miRNAs 34b/c i 148a amb 37,2% i 44,8% respectivament (Taula 12).

6.4.2.1. Anàlisi estadístic estadis I - IV.

6.4.2.1.1. Correlació dels marcadors amb les dades clinicopatològiques.

Veure pàgina següent a la Taula 12..

6.4.2.1.2. Anàlisi de supervivència per corbes Kaplan-Meier (Figura 39).

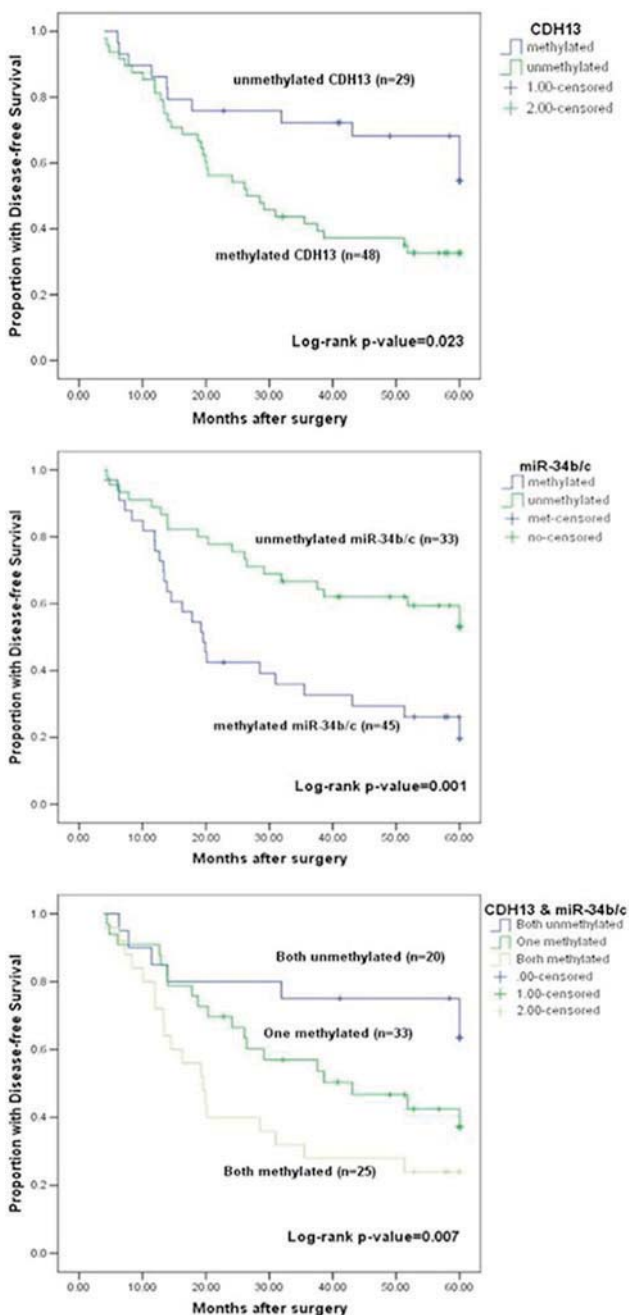


Figura 39. Corbes Kaplan-Meier.

6.4.2.1.3. Anàlisi Univariant i Multivariant dels marcadors significatius.

6.4.2.1.3.1. *CDH13* per regressió de Cox.

Univariant.

HR = 2.47 (95% CI 1.11-5.49, p-value=0.026)

Multivariant ajustat per sexe, estadi i edat.

Taula 13. Anàlisi Multivariant de *CDH13*:

| Variables | B | SE | Wald | df | Sig. P-value | Exp (B) HR | 95.0% CI per Exp(B) | |
|-----------------|-------|-------|-------|----|-----------------|---------------|---------------------|-------|
| | | | | | | | Lower | Upper |
| CDH13_GRUPS | 0.820 | 0.413 | 3.946 | 1 | 0.047 | 2.269 | 1.011 | 5.094 |
| Sexe | 0.128 | 0.457 | 0.078 | 1 | 0.780 | 1.136 | 0.464 | 2.782 |
| Estadi7th_GRUPS | 0.645 | 0.234 | 7.578 | 1 | 0.006 | 1.906 | 1.204 | 3.016 |
| Edat_SUBGRUPS | 0.514 | 0.378 | 1.846 | 1 | 0.174 | 1.672 | 0.797 | 3.510 |

6.4.2.1.3.2. miR-34b/c per regressió de Cox.

Univariant.

HR = 2.54 (95% CI 1.30-4.94, p-value=0.006)

Multivariant ajustat per sexe, estadi i edat.

Taula 14. Anàlisi Multivariant de miR-34b/c:

| Variables | B | SE | Wald | df | Sig. P-value | Exp (B) HR | 95.0% CI per Exp(B) | |
|-----------------|-------|-------|--------|----|-----------------|---------------|---------------------|-------|
| | | | | | | | Lower | Upper |
| Sexe | 0.176 | 0.428 | 0.169 | 1 | 0.681 | 1.193 | 0.516 | 2.759 |
| Estadi7th_GRUPS | 0.867 | 0.248 | 12.235 | 1 | 0.000 | 2.380 | 1.464 | 3.869 |
| Edat_SUBGRUPS | 0.731 | 0.388 | 3.556 | 1 | 0.059 | 2.077 | 0.972 | 4.439 |
| miR-34b/c_GRUPS | 1.230 | 0.366 | 11.289 | 1 | 0.001 | 3.420 | 1.669 | 7.007 |

De totes les comparacions s'evidencia una associació entre l'estat de metilació del promotor de *CDH13* i miR-34b/c i la presència de recidiva. No s'evidencia cap altra associació amb l'estadi, l'afectació limfàtica, l'exposició al tabac i l'edat o el sexe. La metilació dels promotors de *CDH13* i miR34b/c s'associa a la agressivitat del tumor i recurrència de la malaltia. Els tumors amb uns dels dos marcadors tenien mal pronòstic que empitjorava pels tumors que presentaven els dos marcadors metilats.

6.4.2.2. Anàlisi estadístic estadis I - II.

Donat que els estadis inicials és on l'evolució a partir del TNM es presenta una major limitació predictiva de l'evolució de la malaltia i el pacient vam focalitzar l'anàlisi estadístics del biomarcadors en el subgrup de pacients que pertanyien als estadis I i II.

Aquesta cohort estava composta per 56 mostres, 39 corresponents a estadis I (12 Ia; 27 Ib) i 19 estadi II (IIa 3; IIb 16) procedents de 48 homes i 10 dones on la mediana d'edat era de 62.5 anys. L'exposició a l'hàbit tabàquic es corresponia amb 21 exfumadors, 28 fumadors, 7 no fumadors i 1 d'hàbit desconegut. La mitjana de seguiment va ser de 5.9 anys amb el resultat de 28 vius, 19 morts (33%), 11 sense informació i unes dades de recurrència de 26 positius (45%), 28 sense recurrència (48%) i 4 sense dades (8%), al moment de l'elaboració de l'anàlisi.

Les prevalences de metilació es van ser elevades de nou per a *CDH13* i *APC* amb un 65% i 55% respectivament, p16 i *TMS1* amb una prevalença amb un 9% i un 5% respectivament. Els altres biomarcadors van presentar una prevalença destacada amb *IGFBP3*

19% , *RASSF1A* 21% i els miRNAs 34b/c i 148a amb 41% i 43% respectivament. S’observa com les prevalences disminueixen en la majoria dels casos excepte de forma destacada miR-34b/c presentant-se com el biomarcador més significatiu (Taula 15).

6.4.2.2.1. Anàlisi Univariant de Supervivència Global (SG) i Supervivència Lliure de Malaltia (SLM).

Taula 15. Anàlisi Univariant SG i SLM:

| Gen | % Metilació | Log-rank 5anys SG (p-value) | Univariant* Cox 5anys SG HR (CI 95%) | Log-rank 5any SLM (p-value) | Univariant* Cox 5anys SLM HR (CI 95%) |
|------------------|--------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|---|
| p16 | 9% | 0.604 | - | 0.683 | - |
| IGFBP3 | 19% | 0.530 | - | 0.892 | - |
| RASSF1A | 21% | 0.234 | - | 0.334 | - |
| APC | 55% | 0.232 | - | 0.810 | - |
| TMS1 | 5% | 0.449 | - | 0.921 | - |
| CDH13 | 65% | 0.250 | - | 0.057 | 2.44 [0.96-6.22] |
| miR-34b/c | 41% | 0.004 | 2.64 [1.01-6.88] | 0.007 | 2.47 [1.01-4.98] |
| miR-148a | 43% | 0.326 | 1.7 [0.62-4.19] | 0.247 | 1.59 [0.72-3.49] |
| Ambdòs miRNAs | 1+) 42% 2+) 21% | 0.0001 | 2.64 [1.13-5.38] | 0.004 | 2.44 [1.3-4.56] |

* La metilació de miR com a variable de referència

6.4.2.2.2. Anàlisi multivariant de SG i SLM ajustat a sexe, estadi i edat.

Taula 16. Anàlisi Univariant SG i SLM:

| Variable | Log-rank | Multivariant* Cox | Log-rank | Multivariant** Cox |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | 5anys SG (p-value) | 5anys SG HR (CI 95%) | 5any SLM (p-value) | 5anys SLM HR (CI 95%) |
| miR-34b/c metilat; no metilat | 0.01 | 4.3 [1.41-13.1] | 0.007 | 3.1 [1.37-7.1] |
| miR-148a metilat; no metilat | 0.356 | 1.63 [0.58-4.58] | 0.52 | 1.31 [0.58-2.98] |
| Ambdòs miRNAs (1-2;0) | 0.012 | 2.65 [1.24-5.68] | 0.009 | 2.36 [1.23-4.52] |

* Ajustat per sexe, estadi i edat

** Ajustat per estadi

Arrel dels resultats de l'anàlisi Univariant i Multivariant no es va trobar associació significativa de la metilació d'aquests marcadors amb l'estadi, l'afectació limfàtica, l'exposició al tabac, ni l'edat o el sexe. Per altra banda confirmar una clara associació significativa de miR-34b/c amb la recurrència (p=0,007), i per tant com a bon candidat per l'ús d'aquest com a marcador pronòstic.



DISCUSSIÓ

RUGTTTAAUUUGURGTTTTAUTGATAGAUATTTATTTUUURUTTGGTTUUUTTTAGAT GTTGATTGAGATGTTTUUTGATGGGGG

DISCUSSIÓ

El desenvolupament del CPCNP és un procés amb múltiples etapes en el qual s'acumulen tant alteracions genètiques com epigenètiques. La més estudiada d'aquestes últimes i en la que es centra aquesta tesi és la metilació de promotors gènics que acostuma a associar-se a una pèrdua d'expressió [15, 22]. Es produeixen dos canvis de significatius a nivell cel·lular quan parlem de metilació, durant l'evolució del càncer, que provoquen la diferenciació del teixit sa o no tumoral. En el primer la cèl·lula tumoral presenta una hipometilació associada a una inestabilitat cromosòmica i el segon es produeix durant la progressió tumoral i és una metilació de "novo" de les regions riques en residus CpG del DNA. Els canvis en el patró de metilació del DNA són alteracions inicials i freqüents durant la progressió del càncer. Diferents perfils de metilació del DNA estan associats amb diferents tipus de teixits i estats de malaltia [149]. Per tant degut a aquestes característiques i especificitats aquests promotors de gens metilats es poden utilitzar com a eines de diagnòstic, factors pronòstics, i els marcadors predictius de resposta al tractament [15, 150, 151]. Els mètodes basat en la PCR són els més àmpliament utilitzats en la investigació sobre l'estat de metilació d'un sol locus [73, 81]. No obstant això, les empremtes de metilació s'eliminen a partir del DNA genòmic per la DNA polimerasa durant la reacció d'amplificació, per tant, la conversió per bisulfit sòdic és actualment la manera de poder utilitzar i conservar la informació de metilació durant l'amplificació per PCR [72].

La metilació dels promotors dels gens supressors tumorals pot ser un biomarcador útil per al CP. S'han desenvolupat diferents mètodes per determinar l'estat de metilació dels gens, on els més freqüentment usats són els

necessiten en un primer pas el tractament del DNA genòmic amb bisulfit sòdic. No obstant això, la conversió de bisulfit pot danyar el DNA, afectant el rendiment de l'amplificació i també es pot produir una conversió incompleta tot conduint cap a falsos positius [72, 152]. Aquest fet fa que la translació a la pràctica clínica d'aquestes metodologies es vegi dificultada per la incertesa associada a la metodologia emprada.

7.1. ESTUDI INICIAL PLAMET.

L'aplicació de les anàlisis moleculars tindran millor aplicació clínica si funcionen en mostres mínimament invasives pel malalt. En aquest sentit el projecte PLAMET intentava trobar un panell de biomarcadors de metilació pronòstics per al CP; i aconseguir-ho a partir de mostres no invasives com el sèrum i l'esput. La detecció de seqüències de DNA metilat en fluids biològics fàcilment accessibles, com ara el sèrum, és una opció interessant en pacients amb CP ja que es presta a la recollida iterativa durant el seguiment clínic del pacient. Els pacients de càncer incrementen els nivells de DNA circulant, que és alliberat principalment a partir de les cèl·lules tumorals[153]. Es pot argumentar que els casos positius de metilació de DNA són aquells on hi ha una major càrrega tumoral que facilitaria la seva detecció. La presència de marcadors de metilació en el sèrum ha estat relacionada amb la circulació de DNA específic i originari del tumor i s'associa a un pitjor pronòstic en diversos càncers [154-156], incloent el CPCNP [157]. En el CP la hipermetilació de promotors ha estat reportada en més de 80 gens, incloent RAR β , TIMP3, p16, *RASSF1A*, MGMT, FHIT, DAPK, *CDHI* i SGPC [158]. Així com en la sang, el DNA tumoral el podem trobar en el material exfoliatiu, d'una manera substancial, en els espurts de pacients amb CP. Alguns gens s'han detectat en esput anys abans que es manifestés un càncer bronquial invasiu [159]. Això ens

indica el paper potencial que poden tenir en el diagnòstic precoç de lesions preneoplàsiques en pacients de risc. No obstant això, aquesta associació de la metilació de determinats gens amb les lesions premalignes pot reduir l'especificitat de l'anàlisi quan es pretén detectar un càncer invasor. Alguna publicació mostra que alguns gens es metilen en fases més precoces de la carcinogènesi (p16), mentre altres ho fan de forma més tardana com *TMSI* o *MGMT*, *DAPK* i *RASSF1A* [160]. L'estudi de factors moleculars en l'esput podria complementar la informació que ens proporciona la classificació citopatològica clàssica de manera poc invasiva. S'obté major quantitat de DNA tumoral de l'esput que del sèrum i/o plasma i a l'estar menys degradat l'anàlisi molecular pot tenir un major rendiment. En estudis sobre supervivents d'un CP de la metilació aberrant en l'esput sobre un panell de 7 gens es va trobar metilació en un 85% de 44 casos [161]. Altres autors amb un panell de 3 gens, *APC*, p16 i *RASSF1A* van detectar metilació en almenys un gen en 63% de les lesions centrals i 44% de les perifèriques de CP primari, mentre que en la mateixa cohort, aquells pacients que tenien malaltia benigna només un entre 102 pacients va donar fals positiu [162]. Belinsky et al. [134] troba un 25% de metilació anormal p16 en l'esput dels fumadors crònics i *Cirincione et al.* [163] el troba en el 18%. Mentre que per als gens més tardans com *RASSF1A* la metilació de l'esput en els fumadors crònics és de 7% i 1% respectivament per als mateixos autors. En relació als resultats obtinguts en el panell de gen supressors de tumors en la sèrie d'espunts, aquests ens permetien per mitjà de la presència d'al·lels metilats en *TMSI* i *CDHI*, sols o en conjunció, la identificació del 80% dels tumors de CPCNP. Això constata les afirmacions que les alteracions epigenètiques s'acumulen durant l'evolució de la malaltia i la conveniència d'analitzar un conjunt de marcadors per permetre una millor identificació de les mostres tumorals en poder trobar-se les alteracions en

estadis i vies de senyalització diferents. Referent a l'anàlisi del miR-124a1 aquest es presentava el silenciament epigenètic en les línies de CPCNP en contrast amb la línia de característiques no tumorals.

7.2. SELECCIÓ DE LA TÈCNICA.

El nostre estudi inicial PLAMET en les mostres no invasives utilitzant la metodologia del MSP va il·lustrar la dificultat en obtenir resultats sòlids i interpretables sobre l'estatus de metilació en mostres clíniques. En les nostres mans, observàvem una possible sobreestimació de metilació i una manca d'especificitat. Tenint en compte que aquests resultats es van obtenir en un dels laboratoris de referència, aquests feien palesa el que ha estat una evidència progressiva en el camp: la MSP com a tècnica de cribratge en contextos de recerca funciona bé però en mostres clíniques subòptimes no proporciona els mateixos resultats. Això és secundari a la major probabilitat de que es maximitzi una conversió per bisulfit incompleta ja que utilitzen *primers* dependents de metilació. Això possibilita que els falsos positius siguin més freqüents en l'anàlisi de les mostres diluïdes com el DNA en sèrum. Si a més hem de considerar que en les mostres no invasives hi ha una proporció molt elevada de cèl·lules normals i que pot existir un efecte camp on en absència de tumor ja pot existir metilació hem de disposar de tècniques que analíticament siguin robustes, sensibles i confiables que disminueixin al màxim un efecte confusor de la tècnica.

Es va decidir comparar l'MSP, assumida per molts com a tècnica rutinària però no està exempta de controvèrsia i amb una tècnica també fonamentada en la PCR però amb una resolució del producte final diferent, com és el MCA, per mitjà de l'ús de MIPs (Methylation Independent *Primers*). Malgrat l'existència

de tècniques quantitatives basades en l'MSP no es va considerar necessari fer una valoració per aquestes metodologies ja que l'exposició al fals positiu prové del disseny i seqüència dels *primers*, especialment per a la condició de DNA metilat. Aquest fet treia rellevància a l'ús d'agents intercalants fluorescents, sondes o altres sistemes de visualitzar el producte final obtingut.

En comparar el conjunt de 20 mostres tumorals amb el seu teixit no tumoral associat per ambdues tècniques es van poder constatar les divergències arrel dels resultats obtinguts. Inicialment, el nombre diferent de mostres tumorals metilades detectades per l'MSP en relació amb el MCA l'associaven a l'elevada sensibilitat aportada per la tècnica, al ser capaç de detectar un al·lel metilat entre 1000 no metilats [159, 164]. El gran nombre de resultats positius per al conjunt de mostres no tumorals per part de l'anàlisi de l'MSP feia sospitar d'una sobreestimació de la condició metilada. Aquest fet possiblement era produït per una mala conversió del bisulfit sòdic que l'MSP detectava per la seva elevada sensibilitat analítica ja que els controls interns de la PCR eren correctes. En contrapartida al grup no tumoral analitzat per la MCA, mostrava únicament 2 mostres metilades pel promotor del gen *APC*, fet que es troba en consonància amb resultats anteriorment descrits en la bibliografia [111, 165]. Tanmateix, destacar un reduït nombre de mostres que diferia en l'estat de metilació entre ambdues tècniques (MCA+ i MSP-) que només podem interpretar pel número y la naturalesa diferent de residus analitzats.

Un cop establert que la MCA podria oferir uns resultats més coherents i específics pel tumor vam volen aprofundir més en la caracterització de la MCA i quina era la sensibilitat analítica.

7.3. CARACTERITZACIÓ DEL BS-MCA.

Per continuar amb el projecte es va seleccionar la tècnica MCA després d'una PCR anellada (*nested*), de manera que això ens permetia enriquir la seqüència diana per a l'anàlisi tot augmentant així la sensibilitat analítica. Basada en que la permanència inalterada de les 5-metil citosines i la conversió de les citosines a uracil després del tractament amb Bisulfit sòdic el perfil de dissociació d'un producte de PCR metilat tindrà un contingut de GC més elevat i per tant una temperatura de fusió més alta que la del corresponent producte no metilat el que permetrà la seva discriminació mitjançant les corbes de fusió.

La BS-MCA que hem dissenyat és un mètode de PCR de dues etapes on sempre s'utilitzen *primers* dirigits específicament a seqüències totalment convertides per el Bisulfit sòdic (Bisulfite-specific), el que en resulta una minimització dels resultats falsos positius associats a la conversió incompleta tal com hem demostrat. No obstant això, el disseny de Methylation Independent *Primers* (MIPs) no és automàtic per a qualsevol seqüència degut a l'alta densitat de GC present en els promotors dels gens supressors tumorals. Quan es fa molt difícil aquest disseny la introducció de modificacions per incorporació de inosinas és una alternativa efectiva per tal d'evitar la orientació de la PCR cap els residus CpG, El desenvolupament de la tècnica per al gen *IGFBP3* ha mostrat que la introducció d'una inosina a la seqüència del *primero* redueix la sensibilitat i especificitat d'aquest mètode. Pel que fa a el biaix de la PCR cap a l'amplificació del DNA no metilat que s'associa sovint amb l'ús de MIPs [148] hem demostrat que pot ser compensat per amb una PCR *nested* o anellada. L'avantatge esperat per mitjà de l'ús de *primerBS* només és evident quan s'utilitzen en els dos passos de la PCR. L'ús de MIPs només en la primera ronda de PCR no va mostrar una amplificació equilibrada de tots dos al·lels el que confirma que l'ús d'encebadors

específics de metilació porta a una sobreestimació de l'estat de metilació [147]. Aquest biaix és més evident quan s'amplifica material de qualitat subòptima, que augmenta la probabilitat d'artefactes de la PCR [166]. Prèviament s'ha suggerit que el *primerBS* pot portar un descens de la sensibilitat analítica cosa que nosaltres no hem confirmat. Si es volen introduir residus CpG en la seqüència dels *primers* dirigits a revertir aquest possible biaix s'ha de tenir en compte que altres biaixos són també possibles.

La BS-MCA combina robustesa amb una excel·lent especificitat i sensibilitat, ja que és capaç d'identificar la presència de 0,8% d'al·lels metilats en la mostra analitzada. Aquesta sensibilitat s'obté avaluant a l'hora múltiples residus CpG de forma, fet que comporta que la tècnica sigui menys vulnerable al comportament de residus específics. En aquesta tècnica el nombre de residus CpG per promotor analitzat oscil·len entre 13 i 36 residus. A més, el MCA en comparació amb els actuals mètodes basats en la visualització en gels d'agarosa o acrilàmida, evita els passos experimentals postPCR, fet que redueix el risc de contaminació. Tanmateix, malgrat la predilecció dels mètodes elaborats en un sol pas a causa de la seva simplicitat, l'enfocament de BS-MCA per mitjà d'una PCR en dues etapes aporta avantatges addicionals com la possibilitat de guardar la mostra després de la primera ronda evitant el risc de degradació del DNA que es presenta una vegada que la conversió de bisulfit s'ha realitzat [78]. Per tant, a través dels diferents anàlisis realitzats per mitjà del BS-MCA dels diferents gens supressors estudiats [98, 112, 157, 167-169].

Aquest rendiment és similar al reportat per HRM on s'utilitza un quelant de segona generació. Hi havia incertesa en relació a l'impacte que podria tenir utilitzar diferents agents fluorescents intercalants (SYBR-Green o HRM).

L'agent intercalant HRM permet la detecció de canvis d'una sola base amb una gran sensibilitat i es podria considerar com una opció atractiva per a l'augment de rendiment de l'assaig ja que l'obtenció de majors saturacions de la mostra de DNA de doble cadena permet molta més precisió òptica i tèrmica en la captació de senyals de fluorescència [80]. No obstant això, aquest mètode ha estat propens a resultats falsos positius quan s'utilitzen *primers* específics de metilació. En estudis reportats anteriorment els intercalants d'HRM mostren la seva eficàcia amb amplicons de seqüència relativament curta, inferiors a 100pb [170, 171] o amb un nombre limitat de CpG analitzades [172]. En el nostre treball, el BS-MCA té el mateix rendiment amb tots dos agents intercalants SYBR-Green i HRM, però mostrant-se més cost-efectiu l'ús del SYBR-Green.

Tanmateix es reconeix una sèrie de limitacions potencials del nostre enfocament. Aquest assaig no pot proporcionar informació sobre l'estat de les citosines individuals que poden ser determinades únicament per les tecnologies de seqüenciació de DNA d'alt rendiment o *arrays* de metilació. No obstant això, el BS-MCA és útil per cribar números relativament elevats de mostres i identificar quines d'aquests estan completament o parcialment metilades i on es podrà estudiar més a fons per seqüenciació d'aquests residus CpG concrets afectes de la modificació. Una altra possible limitació és que BS-MCA permet avaluar únicament l'estat de metilació qualitativament en contrast amb les tècniques d'anàlisi per fluorescència basades en l'MSP. Altres autors [173] han proposat una modificació de l'anàlisi de corbes de fusió o de fusió d'alta resolució per quantificar els nivells de metilació del DNA d'acord amb l'extrapolació en referència a una corba estàndard generada per una sèrie de dilucions del DNA metilat i no metilat de concentració coneguda. Malgrat aquesta afirmació, com que la intensitat de fluorescència podria dependre

d'altres variables, com ara l'eficiència de la conversió de bisulfit, la puresa i/o la quantitat de mostra de DNA, no hem considerat un enfocament quantitatiu com una alternativa viable amb les nostres dades.

7.4. ANÀLISI D'UN PANELL DE BIOMARCADORS DE METILACIÓ EN ADC.

Un cop seleccionat el BS-MCA com la tècnica metodològica del projecte es va seleccionar un panell de gens supressors tumorals. Aquest panell de marcadors per al CPCNP es va seleccionar en base a biomarcadors ja publicats i detallats en series mostrals pròximes a la presentada en aquesta tesi. Atès que la prevalença de la metilació en un sol gen és relativament baixa, es va plantejar l'estudi simultani de diversos gens conformant un panell d'anàlisi. El panell està format per sis gens supressors tumorals i dos miRNAs: *TMSI*, base del treball metodològic; p16, *APC*, *RASSF1A*, *CDH13*, *IGFBP3*, miR-34b/c i miR-148a. Aquests gens supressors de tumors estan relacionats amb el control de cicle cel·lular (p16), senyalització de Ras (*RASSF1A*) i el grup més nombrós, en invasió i metàstasi (*TMSI*, *APC*, *CDH13*, *IGFBP3*, mir-34b/c i miR-148a). Els BS-MCA dels diferents gens supressors de tumors seleccionats mostren una la mateixa sensibilitat i especificitat que per *TMSI*, fet que demostra la fàcil aplicabilitat analítica d'aquest mètode.

Respecte la prevalença de metilació dels marcadors vam obtenir percentatges de metilació semblants en els dos grups estadístics d'anàlisi tant en la cohort representativa de tots el estadis de CP com la cohort restringida per als estadis inicials I i II (*TMSI* 5,1% i 5% ; p16 6,9% i 9% , *IGFBP3* 25,3% i 19% ; *RASSF1A* 30,8% i 21% ; *APC* 61,5% i 55% ; *CDH13* 63,6% i 65% i miR-148a 44,8% i 43% per cada cohort respectivament) amb l'increment més destacable de l'índex

de prevalença de miR-34b/c en la cohort d'estadis inicials (41%) respecte la cohort dels amb tots els estadi representats (37,2%).

La prevalença de metilació de *TMSI* (5%) i p16 (6,4%) en les mostres d'ADC analitzades va ser menor que el reportat per altres autors que utilitzaven tècniques d'anàlisis basades o el mateix MSP[98]. Aquestes discrepàncies no són senzilles d'explicar. La piroseqüència, actualment considerada el *gold standard*, és relativament menys susceptible a la conversió incompleta per bisulfit que el MSP i amb ella s'han detectat percentatges de metilació intermedis entre MSP i BS-MCA [174].

Dels 8 marcadors analitzats 2 mostren una relació clara entre l'estat de metilació i supervivència. La metilació del gen *CDH13* i del miRNA-34b/c s'associa a una major taxa de recidives. Quan es va restringir l'anàlisi a les 56 mostres d'ADC estadis I i II només es va confirmar aquesta associació pel promotor del miR-34b/c. Aquests resultats confirmen que els miRNAs juguen un paper important en el desenvolupament i progressió del càncer. El descobriment de la seva funció reguladora ha afegit un nou nivell de complexitat en la comprensió de la base molecular del càncer [3]. Curiosament, l'expressió dels miRNAs és sovint regulada a la baixa en les cèl·lules canceroses [175] on sembla promoure la transformació cel·lular[176]. Aquesta desregulació pot ocórrer per diferents mecanismes com són ara el nombre de còpies de DNA [177], la mutació [178], l'error en la regulació post-transcripcional, la regulació per factors de transcripció [179], una biogènesi defectuosa dels miRNAs [176] així com la metilació de les regions reguladores de miRNAs específics [143, 180-182].

El miR-34b/c és inactivat en múltiples tipus de càncer per hipermetilació dels diversos promotors que conformen 34b/c, sent un esdeveniment relativament comú en el CPCNP. En un estudi anterior *Wang et al.* [142] van demostrar que l'estat de metilació de miR-34b/c s'associava a una pitjor supervivència global ($P=0,010$) i una pitjor supervivència lliure de malaltia ($P=0,017$). En el nostre estudi trobem que la hipermetilació miR-34b/c és un esdeveniment freqüent en ADC (41%), confirmant estudis anteriors fets en CPCNP [142, 183]. Aquestes dades són coherents amb els nostres resultats on els pacients d'ADC en estadis primerenc amb metilació de miR-34b/c tenen una major probabilitat de recurrència i de mal pronòstic de forma més significativa en els estadis inicials I i II ($P=0,007$). Aquesta hipermetilació és un factor pronòstic independent per l'estadi I. Diversos estudis han demostrat que miR-34b/c forma part de la via de p53, gen que està freqüentment mutat al CP. Malgrat tot, no es troba associació entre la mutació de p53 i l'expressió de miR-34b/c en les línies d'ADC [69]. Tot i que miR-34b/c és objectiu transcripcional de p53 sembla ser que és necessària per al funcionament de p53 com es va demostrar a través d'un ratolí deficient per a miR-34 [184].

El paper de l'expressió de miR-34b/c com a marcador pronòstic genera controvèrsia. *Landi et al.* [185] van trobar que l'expressió de miR-34b/c mesurada a través de *microarrays* s'associava amb mal pronòstic a pacients amb CPCNP ressecats quirúrgicament. No obstant, en un estudi posterior [186] no es va poder validar aquesta observació. Aquestes troballes indiquen que miR-34b/c pot actuar com a un supressor tumoral en l'ADC, la qual cosa és consistent amb el seu paper demostrat en altres tipus de càncers humans [187-190]. *Lujambio et al.* [143] van mostrar que la hipermetilació aberrant del promotor de miR-34b/c en el tumor s'associa de manera significativa amb l'aparició de metàstasi en

ganglis limfàtics en diversos tipus de càncer, incloent el CP. Mentre que la proporció de casos que presentaven metilació del promotor de miR-34b/c era semblant a la nostra 54% (34/63), *Lujambio et al.* [143] evidenciaven una associació amb metàstasis ganglionars que nosaltres no hem confirmat en els 86 pacients d'ADC analitzats. *Wang et al.* [142] també evidenciaven una associació amb el gènere que nosaltres no hem replicat. Aquesta discrepància pot estar associada al reduït nombre de dones analitzades a la nostra sèrie.

El gen *CDH13* com a gen supressor de tumor participa en el manteniment de les unions intercel·lulars i la seva expressió està reduïda molt sovint en tumors pulmonars. La prevalença de metilació de *CDH13* trobada (65%) està en línia amb les troballes prèvies d'altres grups [128, 129, 168, 191, 192]. *Kim et al.* [168] observen hipermetilació en un 43% dels més de 300 pacients analitzats. D'aquest s'analitzen 122 són ADC trobant que la metilació es presenta més freqüentment en l'ADC (49%) que en el SCC (35%; $P=0,03$). La metilació de *CDH13* s'associava amb la progressió de la malaltia en pacients amb CPCNP, però no amb la supervivència del pacient, coincidint amb els nostres resultats. La metilació de *CDH13* és més freqüent en estadis avançats i és un factor pronòstic quan es tenen en compte tots els estadis. Aquests resultats confirmen els de Kim et al. on la presència d'afectació limfàtica s'associa a la hipermetilació del promotor de *CDH13*. No obstant això, aquest resultat no és consistent amb els nostres ni amb el de altres autors [193] que van informar que la pèrdua de *CDH13* en tumors primaris de pulmó no es podia associar amb la presència de metàstasi en els ganglis limfàtics. Posteriorment, *Brock et al.* [157] analitzen la metilació d'un panell de 7 gens en tumor, gangli hiliar i mediastínic d'una sèrie de 167 pacients intervinguts amb estadi I. Es tracta d'un estudi retrospectiu en el qual es van seleccionar de 715 casos intervinguts amb intenció

de cirurgia radical, pacients recaiguts i 116 controls amb característiques similars. Contrasta respecte a estudis previs l'elevada freqüència de metilació a nivell ganglionar, tant en els pacients recaiguts com en els controls (ex· DAPK 42,5% i 41,5% respectivament). Dels 7 gens analitzats, només p16 i *CDH13* estan més freqüentment metilats de manera significativa en pacients recaiguts que en els controls. La metilació de p16 i *CDH13* al tumor suposa una OR de recidiva de 8,0 [2,5-25,51], i si estan tots dos metilats en tumor i gangli mediastínic la supervivència lliure de recaiguda als 5 anys és significativament inferior (14,3% vs. 63,1% , $p < 0,001$). Aquests resultats es van validar en una cohort de 20 pacients estadi I. És el primer estudi que mostra una gran capacitat dels marcadors de metilació determinats en el tumor i en els ganglis limfàtics per predir el risc de recaiguda.

Al la inversa que els biomarcadors *CDH13* i miR-34b/c, el miR-148a presenta una tendència a associar-se estadis N1 així com amb els estadis inicials. Aquests resultats concorden amb les dades aportades per diversos autors implicant la metilació del DNA associada al silenciament de l'expressió de miR-148a en línies cel·lulars de diversos càncers humans establertes a partir de metàstasis en ganglis limfàtics i suggerint el seu paper en el desenvolupament de metàstasis [143]. Tanmateix, la presència de metilació en miR-148a en combinació amb la de miR-34b/c és presenta com un clar marcador pronòstic ($P=0,009$) malgrat que no aporta informació independent del miR-34b/c ($P=0,007$). En conclusió, els nostres resultats mostren que el miR-34b/c s'inactiva amb freqüència pel promotor de la metilació de DNA en l'ADC i que la pèrdua de miR-34b/c indueix l'expressió d'un fenotip més agressiu i invasiu en aquest subtipus histològic del CP. A més, la metilació de miR-34b/c es presenta com un candidat fiable per ser un marcador pronòstic independent en la fase inicial d'ADC i és potencialment útil per a la selecció d'un subgrup de tumors en estadi I amb un

major risc de recurrència o de mort després de la resecció pulmonar que es beneficiarien d'una teràpia addicional intervenció.

És Important destacar que la majoria d'aquest treballs han estat realitzats amb metodologies basades amb el mateix principi que l'MSP. Després de comparar dues metodologies subjectes a la conversió per bisulfit i al biaix intrínsec de la utilització de *primers* específics per seqüència metilada podem dir que l'MSP està supeditat a aquestes dues fonts d'error induït. Per aquesta raó assumim que pot haver-hi una sobreestimació de la prevalença dels marcadors.

Diversos autors han provat de restaurar la funció dels miRNAs amb propietats de gens supressors de tumors testant diverses estratègies [194]. Un dels enfocaments amb potencial, per tal d'ajudar a recuperar l'expressió dels gens supressors de tumors i els miRNAs regulats per la metilació del DNA, és l'ús d'agents desmetilants del DNA com el 5-aza-2'-desoxicitidina i inhibidors de l'histona desacetilasa. Aquests fàrmacs han demostrat un benefici terapèutic en algunes malalties hematològiques i fins i tot han demostrat activitat antitumoral en el CPCNP quimiorrefractari [195]. No obstant això, cal destacar la limitació existent d'aquesta estratègia ja que la falta d'especificitat d'aquests agents poden restaurar l'expressió d'un gran nombre de gens i miRNAs no relacionats amb l'objectiu terapèutic .

7.5. CONSIDERACIONS FINALS.

La disponibilitat de marcadors moleculars predictius de recaiguda ha de permetre seleccionar el subgrup que seria candidat a rebre tractament adjuvant després de la cirurgia. Aquesta prospecció ajudarà a discernir el perquè alguns malalts amb CPCNP estadi I es curen amb la cirurgia, mentre d'altres tenen una alta probabilitat de recidiva. Una continuació possible del treball realitzat seria

analitzar la presència dels biomarcadors *CDH13* i els miRNAs, miR-34b/c i miR-148a en els seus ganglis limfàtics regionals lliures de tumor i tumorals per reestadificar els tumors. La detecció de la hipermetilació en ganglis histològicament lliures de tumor, es pot interpretar com a presència de DNA tumoral i malaltia subclínica, el que modificaria l'estadiatge patològic. És important destacar que la quimioteràpia adjuvant després de la cirurgia millora la supervivència dels estadis II i IIIA, però no en l'estadi I. No és agosarat, doncs afirmar que, superar el valor pronòstic de la classificació pTNM al ADC resecable pot tenir conseqüències per la pràctica clínica diària. Cal confirmar les dades de forma prospectiva en poblacions ben caracteritzades (p.ex. malalts inclosos en assajos clínics) per confirmar les observacions aquí reportades.

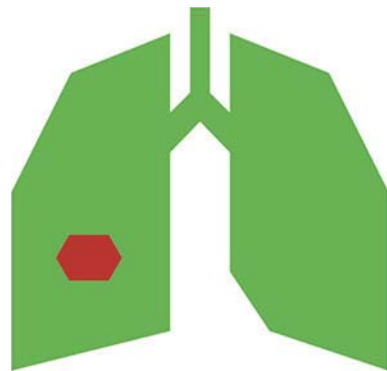


SUMARI

RUGTTTAAUUUGUAGTTTTAUTGATAGAUATTTATTTUUUUAUTTGGTTUUUUTTTATGTATGGATGTTGATTGGAGATGTTTUUTGTATGGGGG

SUMARI

1. La tècnica de l'MSP (Methylation Specific PCR) ofereix una alta taxa de falsos positius lligats a una alta sensibilitat a la conversió incompleta per bisulfit.
2. El BS-MCA (Bisulfite conversion Specific Melting Curve Analysis) és una alternativa sòlida, sensible i reproduïble per a l'avaluació de la metilació del DNA en mostres tumorals.
3. La presència d'hipermetilació en els promotors de miR-34b/c i *CDH13* s'associa a la agressivitat tumoral en adenocarcinoma pulmonar (ADC).
4. La hipermetilació del promotor de miR-34b/c és un marcador pronòstic independent en els adenocarcinomes pulmonars (ADC) d'estadis I i II.
5. La hipermetilació conjunta dels promotors de miR-34b/c i miR-148a és també un marcador pronòstic en els adenocarcinomes pulmonars d'estadis I i II.

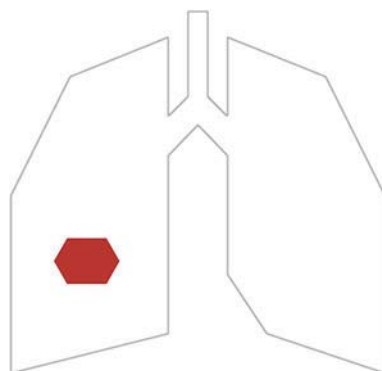


CONCLUSIONS

AUGTTTAAU|CG|ARGTTTTAL|CG|ATAGAUATTTATTTUURU|CG|GTTUUU|TTTA|TGTGAGATGTTTUUC|G|ATGGGGG

CONCLUSIONS

1. El BS-MCA és una alternativa adequada per a l'avaluació ràpida, reproducible i eficient de la metilació del DNA de línies cel·lulars i mostres clíniques, ja que no es troba tant subjecte a l'error produït pel bisulfit sòdic i al biaix en primers selectius envers la condició metilada.
2. L'estat d'hipermetilació de miR-34b/c sol o en combinació amb miR-148a és un marcador molecular pronòstic independent en els ADC d'estadis I i II.



BIBLIOGRAFIA

RUGTTTAVU|CG|URGTTTTAL|CG|ATAGAUATTTATTTUURU|CG|GTTUUU|TTTTA|TGTGAGATGTTTU|CG|ATG66666

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.** *Ann Oncol* 2007, **18**:581-592.
2. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**:646-674.
4. Vogelstein B, Kinzler KW. **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 2004, **10**:789-799.
5. Hanahan D, Coussens LM. **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** *Cancer Cell*, **21**:309-322.
6. Foulds L. **Tumor progression.** *Cancer Res* 1957, **17**:355-356.
7. Nowell PC. **Tumor progression: a brief historical perspective.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**:261-266.
8. Nowell PC, Croce CM. **Chromosomes, genes, and cancer.** *Am J Pathol* 1986, **125**:7-15.
9. Esteller M. **Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next?** *Genes Cancer*, **2**:604-606.
10. Goll MG, Bestor TH. **Eukaryotic cytosine methyltransferases.** *Annu Rev Biochem* 2005, **74**:481-514.
11. Feinberg AP, Vogelstein B. **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** *Nature* 1983, **301**:89-92.
12. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. **Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation.** *Science* 2003, **300**:455.
13. Karpf AR, Matsui S. **Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells.** *Cancer Res* 2005, **65**:8635-8639.
14. Schulz WA. **L1 retrotransposons in human cancers.** *J Biomed Biotechnol* 2006, **2006**:83672.
15. Esteller M. **Epigenetics in cancer.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1148-1159.
16. Baylin SB, Herman JG. **Promoter hypermethylation--can this change alone ever designate true tumor suppressor gene function?** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:664-665.

17. Baylin SB, Fearon ER, Vogelstein B, de Bustros A, Sharkis SJ, Burke PJ, Staal SP, Nelkin BD. **Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies.** *Blood* 1987, **70**:412-417.
18. Jones PA, Baylin SB. **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:415-428.
19. Costello JF, Plass C. **Methylation matters.** *J Med Genet* 2001, **38**:285-303.
20. Baylin SB. **DNA methylation and gene silencing in cancer.** *Nat Clin Pract Oncol* 2005, **2 Suppl 1**:S4-11.
21. Feinberg AP, Tycko B. **The history of cancer epigenetics.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:143-153.
22. Herman JG, Baylin SB. **Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.** *N Engl J Med* 2003, **349**:2042-2054.
23. Baylin SB, Herman JG. **DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.** *Trends Genet* 2000, **16**:168-174.
24. Jones PA, Laird PW. **Cancer epigenetics comes of age.** *Nat Genet* 1999, **21**:163-167.
25. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.** *Cancer Res* 1999, **59**:793-797.
26. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* 2000, **60**:2368-2371.
27. Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. **Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* 2001, **61**:4689-4692.
28. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. **CpG island methylator phenotype in colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:8681-8686.
29. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. **DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells.** *Nat Genet* 2003, **33**:61-65.

30. Bestor TH. **Unanswered questions about the role of promoter methylation in carcinogenesis.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **983**:22-27.
31. Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B. **Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene.** *Cancer Cell* 2003, **3**:89-95.
32. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, et al. **DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.** *Nature* 2002, **416**:552-556.
33. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, et al. **Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns.** *Nat Genet* 2000, **24**:132-138.
34. Bell AC, Felsenfeld G. **Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.** *Nature* 2000, **405**:482-485.
35. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** *Nat Genet* 1998, **19**:187-191.
36. Feng Q, Zhang Y. **The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes.** *Genes Dev* 2001, **15**:827-832.
37. Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. **DNA methyltransferases get connected to chromatin.** *Trends Genet* 2002, **18**:275-277.
38. El-Osta A, Kantharidis P, Zalcborg JR, Wolffe AP. **Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1844-1857.
39. Berdasco M, Esteller M. **Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry.** *Dev Cell*, **19**:698-711.
40. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:2999-3004.
41. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. **Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer.** *Cell Cycle* 2008, **7**:2643-2646.

42. Iorio MV, Croce CM. **microRNA involvement in human cancer.** *Carcinogenesis*, **33**:1126-1133.
43. Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C, et al. **A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function.** *Nat Genet* 2009, **41**:365-370.
44. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. **Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.** *Nat Med*, **17**:330-339.
45. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. **Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship.** *Mayo Clin Proc* 2008, **83**:584-594.
46. Wistuba II, Gazdar AF. **Lung cancer preneoplasia.** *Annu Rev Pathol* 2006, **1**:331-348.
47. Stampfli MR, Anderson GP. **How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:377-384.
48. Kazarian M, Calbo J, Proost N, Carpenter CL, Berns A, Laird-Offringa IA. **Immune response in lung cancer mouse model mimics human anti-Hu reactivity.** *J Neuroimmunol* 2009, **217**:38-45.
49. Soh J, Toyooka S, Ichihara S, Asano H, Kobayashi N, Suehisa H, Otani H, Yamamoto H, Ichimura K, Kiura K, et al. **Sequential molecular changes during multistage pathogenesis of small peripheral adenocarcinomas of the lung.** *J Thorac Oncol* 2008, **3**:340-347.
50. Denoix P. [Not available]. *Bull Inst Natl Hyg* 1946, **1**:12-17.
51. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, et al. **International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma.** *J Thorac Oncol*, **6**:244-285.
52. Cano Alonso R, Herraiz Hidalgo L, Alvarez Moreno E, Paniagua Correa C, Martinez de Vega V. **[Role of imaging techniques in the TNM classification of non-small cell bronchogenic carcinoma].** *Radiologia*, **54**:306-320.
53. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. **The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2009, **4**:568-577.

54. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. **Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2004, **350**:351-360.
55. Roviario G, Varoli F, Vergani C, Nucca O, Maciocco M, Grignani F. **Long-term survival after videothoroscopic lobectomy for stage I lung cancer.** *Chest* 2004, **126**:725-732.
56. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Inculet R, Vallieres E, et al. **Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2005, **352**:2589-2597.
57. Bonomi P, Kim K, Fairclough D, Cella D, Kugler J, Rowinsky E, Jiroutek M, Johnson D. **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**:623-631.
58. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crino L, Gridelli C, Ricci S, Matano E, Boni C, Marangolo M, Failla G, et al. **Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**:4285-4291.
59. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH. **Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2002, **346**:92-98.
60. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, et al. **Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial.** *Lancet Oncol* 2006, **7**:719-727.
61. Onishi H, Araki T, Shirato H, Nagata Y, Hiraoka M, Gomi K, Yamashita T, Niibe Y, Karasawa K, Hayakawa K, 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**:1623-1631.
62. Onishi H, Kuriyama K, Komiyama T, Tanaka S, Sano N, Marino K, Ikenaga S, Araki T, Uematsu M. **Clinical outcomes of stereotactic radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer using a novel irradiation technique: patient self-controlled breath-hold and beam**

- switching using a combination of linear accelerator and CT scanner.** *Lung Cancer* 2004, **45**:45-55.
63. Goldstraw P. **New Staging System: How Does It Affect Our Practice?** *J Clin Oncol*.
64. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L. **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**:706-714.
65. Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, Laird PW, Laird-Offringa IA. **The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma.** *Dis Markers* 2007, **23**:5-30.
66. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, et al. **Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Cell* 2006, **9**:189-198.
67. Brambilla E, Gazdar A. **Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies.** *Eur Respir J* 2009, **33**:1485-1497.
68. Eder M, Scherr M. **MicroRNA and lung cancer.** *N Engl J Med* 2005, **352**:2446-2448.
69. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, et al. **p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes.** *Curr Biol* 2007, **17**:1298-1307.
70. He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. **microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:819-822.
71. Fiegl H, Elmasry K. **Cancer diagnosis, risk assessment and prediction of therapeutic response by means of DNA methylation markers.** *Dis Markers* 2007, **23**:89-96.
72. Kristensen LS, Hansen LL. **PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment.** *Clin Chem* 2009, **55**:1471-1483.
73. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. **High sensitivity mapping of methylated cytosines.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:2990-2997.
74. Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. **Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing.** *Methods* 2002, **27**:101-107.

75. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:9821-9826.
76. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. **MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:E32.
77. Akey DT, Akey JM, Zhang K, Jin L. **Assaying DNA methylation based on high-throughput melting curve approaches.** *Genomics* 2002, **80**:376-384.
78. Guldberg P, Worm J, Gronbaek K. **Profiling DNA methylation by melting analysis.** *Methods* 2002, **27**:121-127.
79. Bonanno C, Shehi E, Adlerstein D, Makrigiorgos GM. **MS-FLAG, a novel real-time signal generation method for methylation-specific PCR.** *Clin Chem* 2007, **53**:2119-2127.
80. Wojdacz TK, Dobrovic A. **Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:e41.
81. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. **A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:1827-1831.
82. Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. **Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis.** *Electrophoresis* 2002, **23**:4072-4079.
83. Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. **De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology.** *Anal Biochem* 2004, **333**:119-127.
84. Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T. **Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:e78.
85. Xiong Z, Laird PW. **COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:2532-2534.
86. Gonzalgo ML, Jones PA. **Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE).** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:2529-2531.
87. Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwoppe I, Tetzner R, Ziebarth H, Berlin K. **A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:e10.

88. Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. **In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis.** *Clin Chem* 2001, **47**:1183-1189.
89. Brattain MG, Brattain DE, Fine WD, Khaled FM, Marks ME, Kimball PM, Arcolano LA, Danbury BH. **Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts.** *Oncodev Biol Med* 1981, **2**:355-366.
90. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *J Natl Cancer Inst* 1973, **51**:1417-1423.
91. Ashkenazi A, Dixit VM. **Death receptors: signaling and modulation.** *Science* 1998, **281**:1305-1308.
92. Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. **ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293**:1314-1318.
93. Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. **Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation.** *J Immunol* 2003, **171**:6154-6163.
94. McConnell BB, Vertino PM. **TMS1/ASC: the cancer connection.** *Apoptosis* 2004, **9**:5-18.
95. Parsons MJ, Vertino PM. **Dual role of TMS1/ASC in death receptor signaling.** *Oncogene* 2006, **25**:6948-6958.
96. Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. **TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers.** *Cancer Res* 2000, **60**:6236-6242.
97. Guan X, Sagara J, Yokoyama T, Koganehira Y, Oguchi M, Saida T, Taniguchi S. **ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma.** *Int J Cancer* 2003, **107**:202-208.
98. Machida EO, Brock MV, Hooker CM, Nakayama J, Ishida A, Amano J, Picchi MA, Belinsky SA, Herman JG, Taniguchi S, Baylin SB. **Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**:6210-6218.
99. Virmani A, Rathi A, Sugio K, Sathyanarayana UG, Toyooka S, Kischel FC, Tonk V, Padar A, Takahashi T, Roth JA, et al. **Aberrant methylation**

- of **TMS1** in small cell, non small cell lung cancer and breast cancer. *Int J Cancer* 2003, **106**:198-204.
100. Yokoyama T, Sagara J, Guan X, Masumoto J, Takeoka M, Komiyama Y, Miyata K, Higuchi K, Taniguchi S. **Methylation of ASC/TMS1, a proapoptotic gene responsible for activating procaspase-1, in human colorectal cancer.** *Cancer Lett* 2003, **202**:101-108.
101. Johnson BE. **Second lung cancers in patients after treatment for an initial lung cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**:1335-1345.
102. Stimson KM, Vertino PM. **Methylation-mediated silencing of TMS1/ASC is accompanied by histone hypoacetylation and CpG island-localized changes in chromatin architecture.** *J Biol Chem* 2002, **277**:4951-4958.
103. De Vries EM, Ricke DO, De Vries TN, Hartmann A, Blaszyk H, Liao D, Soussi T, Kovach JS, Sommer SS. **Database of mutations in the p53 and APC tumor suppressor genes designed to facilitate molecular epidemiological analyses.** *Hum Mutat* 1996, **7**:202-213.
104. Laurent-Puig P, Beroud C, Soussi T. **APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:269-270.
105. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. **Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer.** *Cancer Res* 1998, **58**:1130-1134.
106. Wada M, Miller CW, Yokota J, Lee E, Mizoguchi H, Koeffler HP. **Molecular analysis of the adenomatous polyposis coli gene in sarcomas, hematological malignancies and noncolonic, neoplastic tissues.** *J Mol Med (Berl)* 1997, **75**:139-144.
107. Cooper CA, Bubb VJ, Smithson N, Carter RL, Gledhill S, Lamb D, Wyllie AH, Carey FA. **Loss of heterozygosity at 5q21 in non-small cell lung cancer: a frequent event but without evidence of APC mutation.** *J Pathol* 1996, **180**:33-37.
108. D'Amico D, Carbone DP, Johnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. **Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer.** *Cancer Res* 1992, **52**:1996-1999.
109. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. **CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression.** *Cancer Res* 1999, **59**:2302-2306.
110. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, et al. **Hypermethylated**

- APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:1805-1811.
111. Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D. **Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer.** *Cancer Res* 2002, **62**:371-375.
112. Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham HT, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, et al. **Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**:1998-2004.
113. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M. **Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer.** *Cancer* 2006, **108**:129-134.
114. Vos MD, Martinez A, Elam C, Dallol A, Taylor BJ, Latif F, Clark GJ. **A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability.** *Cancer Res* 2004, **64**:4244-4250.
115. Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP. **The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update.** *Histol Histopathol* 2005, **20**:645-663.
116. Firth SM, Baxter RC. **Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins.** *Endocr Rev* 2002, **23**:824-854.
117. Hanafusa T, Shinji T, Shiraha H, Nouse K, Iwasaki Y, Yumoto E, Ono T, Koide N. **Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation.** *BMC Cancer* 2005, **5**:9.
118. Kim HS, Ingermann AR, Tsubaki J, Twigg SM, Walker GE, Oh Y. **Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-mediated pathway in MCF-7 human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:2229-2237.
119. Yu H, Rohan T. **Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:1472-1489.
120. Cao H, Wang G, Meng L, Shen H, Feng Z, Liu Q, Du J. **Association between circulating levels of IGF-1 and IGFBP-3 and lung cancer risk: a meta-analysis.** *PLoS One*, **7**:e49884.
121. Chang YS, Wang L, Liu D, Mao L, Hong WK, Khuri FR, Lee HY. **Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:3669-3675.

122. Chang YS, Kong G, Sun S, Liu D, El-Naggar AK, Khuri FR, Hong WK, Lee HY. **Clinical significance of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in stage I non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:3796-3802.
123. Chen B, Liu S, Xu W, Wang X, Zhao W, Wu J. **IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: a meta-analysis based on nested case-control studies.** *J Exp Clin Cancer Res* 2009, **28**:89.
124. Behrens J. **The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis.** *Breast Cancer Res Treat* 1993, **24**:175-184.
125. Takeichi M. **Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.** *Science* 1991, **251**:1451-1455.
126. Takeichi M, Watabe M, Shibamoto S, Ito F, Oda H, Uemura T, Shimamura K. **Dynamic control of cell-cell adhesion for multicellular organization.** *C R Acad Sci III* 1993, **316**:813-821.
127. Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Miyajima K, Makarla P, Sathyanarayana UG, Yin J, Sato F, Shivapurkar N, Meltzer SJ, Gazdar AF. **Aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) promoter region in colorectal cancers and adenomas.** *Cancer Res* 2002, **62**:3382-3386.
128. Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. **The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer.** *Hum Genet* 1998, **103**:96-101.
129. Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF. **Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas.** *Cancer Res* 2001, **61**:4556-4560.
130. Kawakami M, Staub J, Cliby W, Hartmann L, Smith DI, Shridhar V. **Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer.** *Int J Oncol* 1999, **15**:715-720.
131. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS, 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. **A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.** *Science* 1994, **264**:436-440.
132. Liggett WH, Jr., Sidransky D. **Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.** *J Clin Oncol* 1998, **16**:1197-1206.
133. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. **Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB.** *Oncogene* 1994, **9**:3375-3378.
134. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. **Aberrant methylation of**

- p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:11891-11896.
135. Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. **Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance.** *J Clin Oncol* 2001, **19**:2033-2040.
136. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, et al. **A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature* 2007, **447**:1130-1134.
137. He X, He L, Hannon GJ. **The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network.** *Cancer Res* 2007, **67**:11099-11101.
138. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, et al. **A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome.** *Cell* 2006, **124**:207-219.
139. Welch C, Chen Y, Stallings RL. **MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells.** *Oncogene* 2007, **26**:5017-5022.
140. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. **miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:1903-1909.
141. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. **Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer.** *Cell Cycle* 2008, **7**:2591-2600.
142. Wang Z, Chen Z, Gao Y, Li N, Li B, Tan F, Tan X, Lu N, Sun Y, Sun J, et al. **DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage non-small cell lung cancer.** *Cancer Biol Ther*, **11**:490-496.
143. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, et al. **A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:13556-13561.
144. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. **miR-148 targets human DNMT3b protein coding region.** *RNA* 2008, **14**:872-877.
145. Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T. **Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4.** *J Biol Chem* 2008, **283**:9674-9680.
146. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, Tsongalis GJ, Dufresne M, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. **The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis.** *Clin Chem*, **56**:1107-1118.

147. Sasaki M, Anast J, Bassett W, Kawakami T, Sakuragi N, Dahiya R. **Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **309**:305-309.
148. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. **Methylation-sensitive high-resolution melting.** *Nat Protoc* 2008, **3**:1903-1908.
149. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, et al. **High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays.** *Genome Res* 2006, **16**:383-393.
150. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB. **Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**:7089-7093.
151. Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. **Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker.** *Drug Resist Updat* 2004, **7**:267-278.
152. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. **DNA methylation: bisulphite modification and analysis.** *Nat Protoc* 2006, **1**:2353-2364.
153. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. **Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.** *Cancer Res* 1977, **37**:646-650.
154. Herbst A, Wallner M, Rahmig K, Stieber P, Crispin A, Lamerz R, Kolligs FT. **Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009, **21**:565-569.
155. Ikoma H, Ichikawa D, Koike H, Ikoma D, Tani N, Okamoto K, Ochiai T, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H. **Correlation between serum DNA methylation and prognosis in gastric cancer patients.** *Anticancer Res* 2006, **26**:2313-2316.
156. Misawa A, Tanaka S, Yagy S, Tsuchiya K, Iehara T, Sugimoto T, Hosoi H. **RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker.** *Br J Cancer* 2009, **100**:399-404.
157. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, Glockner S, Piantadosi S, Gabrielson E, Pridham G, et al. **DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1118-1128.
158. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. **DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis.** *Oncogene* 2002, **21**:5450-5461.

159. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. **Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum.** *Cancer Res* 2000, **60**:5954-5958.
160. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, Grimes MJ, Harms HJ, Tellez CS, Smith TM, et al. **Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers.** *Cancer Res* 2002, **62**:2370-2377.
161. Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, Crowell RE, Karp DD, Stidley CA, Picchi MA. **Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6505-6511.
162. Schmiemann V, Bocking A, Kazimirek M, Onofre AS, Gabbert HE, Kappes R, Gerharz CD, Grote HJ. **Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:7728-7734.
163. Cirincione R, Lintas C, Conte D, Mariani L, Roz L, Vignola AM, Pastorino U, Sozzi G. **Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: a nested case-control study.** *Int J Cancer* 2006, **118**:1248-1253.
164. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. **Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients.** *Cancer Res* 1999, **59**:67-70.
165. Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, Jordan CD, Kiviat NB, Vesselle H. **DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, **17**:645-654.
166. Gazdar AF, Gao B, Minna JD. **Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science?** *Lung Cancer*, **68**:309-318.
167. Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. **RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication.** *Int J Cancer* 2003, **106**:45-51.
168. Kim JS, Han J, Shim YM, Park J, Kim DH. **Aberrant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma.** *Cancer* 2005, **104**:1825-1833.
169. Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, Dote H, Hanafusa T, Asano H, Naitou M, Doihara H, Kisimoto T, Katayama H, et al. **Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers.** *Int J Cancer* 2007, **120**:566-573.

170. Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. **High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening.** *Hum Mutat* 2009, **30**:860-866.
171. Wojdacz TK, Dobrovic A. **Melting curve assays for DNA methylation analysis.** *Methods Mol Biol* 2009, **507**:229-240.
172. Malentacchi F, Forni G, Vinci S, Orlando C. **Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:e86.
173. Lorente A, Mueller W, Urdangarin E, Lazcoz P, von Deimling A, Castresana JS. **Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR.** *BMC Cancer* 2008, **8**:61.
174. Migheli F, Stoccoro A, Coppede F, Wan Omar WA, Failli A, Consolini R, Seccia M, Spisni R, Miccoli P, Mathers JC, Migliore L. **Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation.** *PLoS One*, **8**:e52501.
175. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature* 2005, **435**:834-838.
176. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. **Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis.** *Nat Genet* 2007, **39**:673-677.
177. Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, Liu CG, Giannakakis A, Alexiou P, Hasegawa K, et al. **Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:7004-7009.
178. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, et al. **A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2005, **353**:1793-1801.
179. Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB. **MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:19678-19683.
180. Baer C, Claus R, Plass C. **Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer.** *Cancer Res*, **73**:473-477.
181. Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, Minichsdorfer C, Lang G, Dome B, End-Pfutzenreuter A, et al. **Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-**

- 193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers.** *Clin Cancer Res*, **18**:1619-1629.
182. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. **Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells.** *Cancer Cell* 2006, **9**:435-443.
183. Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, et al. **Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer.** *Int J Cancer*, **130**:2580-2590.
184. Concepcion CP, Han YC, Mu P, Bonetti C, Yao E, D'Andrea A, Vidigal JA, Maughan WP, Ogrodowski P, Ventura A. **Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice.** *PLoS Genet*, **8**:e1002797.
185. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, Rubagotti M, Goldstein AM, Linnoila I, Marincola FM, et al. **MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer.** *Clin Cancer Res*, **16**:430-441.
186. Voortman J, Goto A, Mendiboure J, Sohn JJ, Schetter AJ, Saito M, Dunant A, Pham TC, Petrini I, Lee A, et al. **MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma.** *Cancer Res*, **70**:8288-8298.
187. Chim CS, Wan TS, Wong KY, Fung TK, Drexler HG, Wong KF. **Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms.** *J Transl Med*, **9**:197.
188. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. **MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth.** *Cancer Res* 2007, **67**:8433-8438.
189. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, et al. **Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma.** *Clin Cancer Res*, **17**:4965-4974.
190. Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Yamamoto H, Maki Y, Muraoka T, Shien K, Furukawa M, Ueno T, et al. **Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer.** *Lung Cancer*, **76**:32-38.

191. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. **Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.** *Adv Cancer Res* 1998, **72**:141-196.
192. Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Tsukuda K, Sugio K, et al. **Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer.** *Int J Cancer* 2003, **103**:153-160.
193. Takeuchi T, Ohtsuki Y. **Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research.** *Histol Histopathol* 2001, **16**:1287-1293.
194. Esteller M. **Non-coding RNAs in human disease.** *Nat Rev Genet*, **12**:861-874.
195. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, et al. **Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer.** *Cancer Discov*, **1**:598-607.

ÍNDEX TAULES I FIGURES

RUGTTTAAU CGURGTTTTAL CGATAGAUATUUWUTGATUT TGRUTTTT CGAGGGGG

TAULES

Taula 1. Seqüència de *primers* per a l’assaig MSP·96

Taula 2. Seqüència de *primers* per a seqüència de bisulfit i MSP de miR-124a1·
.....98

Taula 3. Seqüència de *primers* per a l’assaig MSP· 106

Taula 4. *Primers* utilitzats en l’anàlisi per MCA· 109

Taula 5. Seqüència de *primers* utilitzats en l’anàlisi per BS-MCA· 113

Taula 6. Carecterístiques clinicopatològiques de la sèrie mostral analitzada· .124

Taula 7. Seqüència de *primers* corresponent al panell de marcadors seleccionats
per a l’anàlisi· 125

Taula 8. Resultats del panell d’anàlisi per als 41 esputs· 135

Taula 9. Comparativa de l’anàlisi de metilació per MSP i MCA· 140

Taula 10. Resultats esperats i confirmació del clonatge de l’amplicó de *TMS1*·
..... 149

Taula 11. Nombre de mostres metilades per a les mostres de teixit· 158

Taula 12. Correlació dels marcadors amb les dades clinicopatològiques· 160

Taula 13. Anàlisi Multivariant de *CDH13*· 162

Taula 14. Anàlisi Multivariant de miR-34b/c· 162

Taula 15. Anàlisi Univariant SG i SLM· 164

Taula 16. Anàlisi Univariant SG i SLM· 165

FIGURES:

Figura 1. Mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del càncer.
 23

Figura 2. Biogènesi dels miRNA en l’entorn cel·lular..... 34

Figura 3. Descriptors de TNM. 45

Figura 4. Estadiatge segons TNM.46

Figura 5. Modalitats de tractament per al CP.....51

Figura 6. Canvis epigenètics en l’evolució i progressió de l’ADC.....56

Figura 7. Rutes moleculars principals en la progressió de l’ADC.....57

Figura 8. Conversió amb bisulfit sòdic.....63

Figura 9. Anàlisi per corba de melting66

Figura 10. Localització genòmica del gen TMS1.....84

Figura 11. Localització genòmica del gen APC.86

Figura 12. Localització genòmica del gen RASSF1A.....87

Figura 13. Localització genòmica del gen IGFBP-3.....88

Figura 14. Localització genòmica del gen CDH13.....89

Figura 15. Localització genòmica del gen p16.91

Figura 16. Localització genòmica del gen miRNA-34b/c.....92

Figura 17. Localització genòmica del gen miRNA-148a93

Figura 18. Exemple d’anàlisi per PCR de seqüència genòmica específica de
 bisulfit en diversos miRNAs.....99

Figura 19. Exemple de MSP per al gen TMS1..... 105

Figura 20. Exemple de LC per al gen TMS1..... 108

Figura 21. Seqüències de primers per a TMS1..... 112

Figura 22. Seqüències flanquejants d’attB.117

Figura 23. Representació gràfica per al protocols del sistema Gateway®. 119

Figura 24. Seqüències diana per a Hpy99I. 121

Figura 25. Resultats de l'estat de metilació de mir-124a1 en línia cel·lular. 136

Figura 26. MSP de mir-124a1 en sèrum de pacients afectes de CP.. 137

Figura 27. Comparació patrons de metilació per MSP i MCA de TMS1. 138

Figura 28. Comparació dels patrons dels pics de melting de TMS1 entre LC 2.0 i LC 480 II..... 141

Figura 29. Comparativa de la utilització de primers MIPS i nonBS en l'anàlisi de TMS1. 144

Figura 30. Determinació del grau de sensibilitat per al panell de biomarcadors. 145

Figura 31. Incorporació de la seqüència attB necessària per a la clonació en l'amplicó de TMS1. 147

Figura 32. Figura 32.PCR screening del clonatge de l'amplicó de TMS1..... 148

Figura 33. Seqüències de confirmació..... 150

Figura 34. Determinació del nombre d'adq/°C..... 152

Figura 35. BCORA de TMS1 per l'enzim de restricció Hpy99I..... 154

Figura 36. Utilització de l'agent intercalant fluorescent HRM..... 156

Figura 37. Comparació dels agents intercalants fluorescents..... 156

Figura 38. Demostració de l'ús i localització de la Inosina en els primers BS2 d'IGFBP3..... 157

Figura 39. Corbes Kaplan-Meier..... 161

“Hi ha dues coses infinites: l'Univers i l'estupidesa humana.
I de l'Univers no n'estic segur”

Albert Einstein (1879 - 1955)

