

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA  
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**DETECCIÓN DE ADN TUMORAL Y  
ANÁLISIS DEL GEN DE LA TUBULINA EN  
EL SUERO DE PACIENTES INTERVENIDOS  
DE CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO**

Tesis presentada por Mónica Guillot Morales para optar al título  
de Doctora en Medicina

Dirigida por el Doctor Rafael Rosell Costa

Badalona, Noviembre de 2001

*A Miquel*

*A mis padres, Jaime y Paula,*

*a mis hermanos,*

## **GRACIAS**

Al Doctor Rafael Rosell Costa, director de esta tesis doctoral, por todas las oportunidades que me ha brindado, por la formación en el mundo de la Oncología Médica recibida a lo largo de estos años, por la comprensión en la toma de decisiones y por su apoyo y confianza en estos años de formación.

Al Doctor Albert Abad Estebe, a quien considero por encima de todo un gran amigo, por compartir su experiencia en el mundo oncológico conmigo, por contar con su apoyo y ayuda, tanto en el campo profesional como personal.

Al Doctor Mariano Monzó Planella, por acercarme al mundo de la Biología Molecular, por transmitirme el interés y abrirme la curiosidad en el campo molecular de la Oncología. A Miquel Tarón, Aurora O'Brate y a todos los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, ya que sin ellos no hubiera podido llevar a cabo este proyecto.

Al Doctor Agustí Barnadas Molins por sus valiosos consejos. A la Doctora Carme Balanyà Quintero, por descubrirme la visión más humana de la Oncología. Al Doctor Albert Font Pous, por su compañerismo y apoyo. Al Doctor José Javier Sánchez, por el procesamiento estadístico de los datos, imprescindible para realizar este estudio. A los Doctores Julio Astudillo, Ignacio Escobar y Pedro López de Castro, por mostrarme la perspectiva quirúrgica del mundo oncológico.

A Maite Porta y Beatriz Rodrigo por poder contar siempre con ellas. A Cristina Martín, Carme Aracil, José Luis Manzano, Mireia Margelí, Teresa Morán, José Miguel Sánchez, Toni de la Riba, a todo el equipo de enfermería, secretarías y auxiliares, y a todos los compañeros con los que he compartido momentos inolvidables en estos años de formación en el hospital.

A los distinguidos miembros que constituyen el Tribunal de esta tesis por haber accedido a formar parte del mismo.

---

ÍNDICE	Nº de página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.EPIDEMIOLOGÍA	2
1.2.FACTORES DE RIESGO	4
1.3.DETECCIÓN SELECTIVA DEL CÁNCER DE PULMÓN	5
1.4.CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA. HISTORIA NATURAL	6
Iconografía	10
1.5.PRESENTACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN	17
1.6.FACTORES PRONÓSTICOS	23
1.7.ACTITUD TERAPÉUTICA	24
1.7.1. Cirugía	24
1.7.2. Radioterapia	25
1.7.3. Quimioterapia	26
1.7.4. Tratamiento combinado en estadios localmente avanzados	28
1.8.ALGUNOS ASPECTOS SOBRE EL ESTADIO I-III A DEL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO	29
1.9.GENERALIDADES SOBRE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO.	36
1.9.1. Aspectos moleculares del cáncer de pulmón	36
a. Alteraciones cromosómicas	37
b. Oncogenes alterados en cáncer de pulmón	38
c. Receptores de factor de crecimiento	39
d. Genes supresores tumorales	39

1.9.2. Inestabilidad genética y cáncer de pulmón	40
1.9.3. Implicaciones clínicas. Diagnóstico molecular	41
1.9.4. Terapia génica en el cáncer de pulmón de célula no pequeña	42
1.10. DETECCIÓN DE ADN TUMORAL EN SANGRE PERIFÉRICA	42
1.11. IMPLICACIÓN DEL GEN DE LA $\beta$ -TUBULINA EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO	45
1.11.1. Generalidades de la estructura del gen y del microtúbulo	45
1.11.2. Estructura y función del gen de la tubulina	47
1.11.3. Paclitaxel: un agente antimicrotubulina.	51
1.11.4. Nuevos agentes antitubulina	52
1.11.5. Iconografía	53
1.12. QUIMIORESISTENCIA EN EL CÁNCER DE PULMÓN	55
1.12.1. Mecanismos de quimioresistencia	55
1.12.2. Mecanismos de quimioresistencia mediados por la tubulina	56
1.13. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO	58
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
<b>3. PACIENTES Y MÉTODOS</b>	<b>62</b>
3.1.ORGANIGRAMA DE TRABAJO	63
3.2.PACIENTES	64
3.3.VARIABLES DE ESTUDIO	65
3.4.MÉTODOS	66

3.4.1. Obtención del material genómico	67
3.4.2. Cuantificación del ADN genómico	68
3.4.3. Amplificación del gen de la tubulina	69
3.4.4. Electroforesis del producto amplificado	76
3.4.5. Purificación de la PCR	77
3.4.6. Análisis y secuenciación del ADN genómico	78
3.4.7. Protocolos del laboratorio	80
a. Purificación del ADN sérico con QIAamp® DNA mini kit	80
b. Aislamiento de ADN de tejido con QIAamp® DNA mini kit	82
c. Procesamiento de la muestra sanguínea: suero y población linfocitaria	84
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
3.5.1. Estadística descriptiva	85
3.5.2. Estadística inferencial	85
3.5.3. Análisis de supervivencia	86
3.5.4. Estudio multivariable	86
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>87</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	88
4.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN TUMORAL	90
4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LAS MUTACIONES	90
4.4. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA	92

5. TABLAS Y FIGURAS	94
6. EJEMPLOS DE SECUENCIACIÓN	106
7. DISCUSIÓN	111
8. CONCLUSIONES	124
9. BIBLIOGRAFÍA	127

**Glosario de abreviaturas más utilizadas:**

- ADN= ácido desoxirribonucleico
- ARN= ácido ribonucleico
- BSC= mejor tratamiento de soporte del inglés *best support care*
- CPNM= cáncer de pulmón no microcítico
- CPM= cáncer de pulmón microcítico
- GDP= guanidín difosfato
- GTP= guanidín trifosfato
- HUGTIP= Hospital Universitario Germans Trias i Pujol
- LOH= pérdida de heterocigosidad, del inglés *loss of heterozygosity*
- MAP= proteínas asociadas a microtúbulos
- MI= inestabilidad de microsatélite, del inglés *microsatellite instability*
- MTOC= centro organizador de microtúbulos
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polimerase chain reaction*
- PET: tomografía por emisión de positrones
- PS= *performance status*
- RMN= resonancia magnética nuclear
- rpm= revoluciones por minuto
- RT-PCR= del inglés *reverse-transcription polimerase chain reaction*
- TAC= tomografía axial computerizada
- TNM= Tumor Node Metastasis
- Wt= forma salvaje, del inglés *wild type*

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

### - Incidencia

El cáncer de pulmón se encuentra entre las neoplasias más frecuentes del mundo y es una de las pocas que continúa mostrando una incidencia creciente. A medida que entramos en el siglo XXI, se espera que el cambio en los hábitos de fumar de las últimas dos décadas, junto con una disminución del contenido de alquitrán en los cigarrillos, conduzcan a una nivelación y finalmente a una disminución en la incidencia del cáncer de pulmón.

En España, es uno de los problemas de salud prioritarios. La *incidencia* del cáncer de pulmón, se sitúa en 42,5 casos nuevos por cada 100.000 hombres y año, y 3,6 casos nuevos por cada 100.000 mujeres y año. El número de casos ha aumentado un 21,7% desde 1996 hasta 1999 según los datos del Comité Técnico del Conjunto Mínimo Básico de Datos para el Sistema Nacional de Salud, sucediendo el incremento más importante entre 1996 y 1997 (un 12,8%).

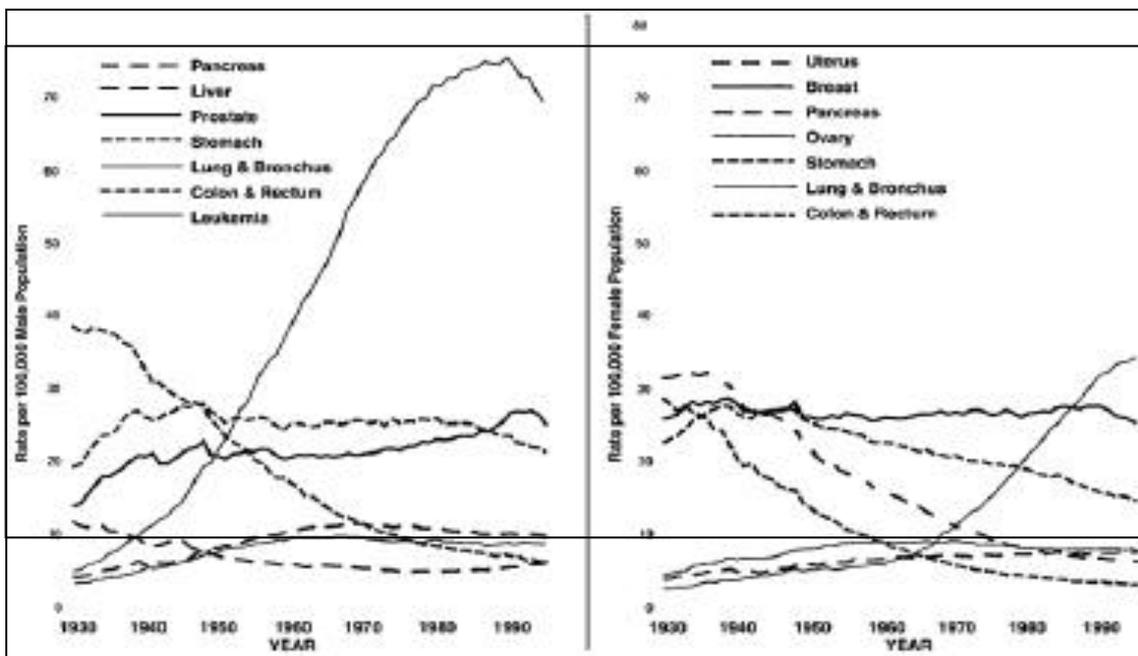
### - Mortalidad

Tanto en los Estados Unidos como en España, el cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer en el hombre, y ha sobrepasado al cáncer de mama como primera causa de muerte por cáncer en la mujer en la última parte de los años 80 (Figura 1). Desgraciadamente, la mortalidad por cáncer de pulmón en los hombres se ha multiplicado por dos en menos de 20 años. Así en 1998 fallecieron en España por esta causa 15.418 varones, frente a los 7.583 de 1980, según consta en la Estadística de Defunciones por causa de muerte correspondiente a 1998, y publicada por el Instituto Nacional de Estadística (INE). El riesgo acumulado en un hombre de presentar un carcinoma de pulmón a lo largo de su vida es de 7,30% y en una mujer de 0,60% (datos de Cataluña en el periodo 1988-1992). Por otra parte, en nuestro medio el 68,4% de los hombres y el 71% de las mujeres que presentan un cáncer de pulmón, fallecen a causa del mismo, y en Cataluña, más de 2.000 hombres mueren al año por esta causa.

A pesar de que en España las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón en varones son inferiores a la de la mayoría de los países europeos, no se observa todavía el descenso iniciado hace 10 o 20 años en esos países. Sin embargo, parece insinuarse el aumento de la incidencia y de la mortalidad por cáncer de pulmón en las mujeres. Estas tendencias reflejan la diferente fase de la epidemia del tabaquismo (y de sus consecuencias), en la que nos encontramos con un particular patrón de consumo de tabaco: una incorporación tardía de las mujeres al hábito pareja al descenso de la prevalencia entre los varones, fenómeno iniciado con retraso respecto a otros países europeos.

**Figura 1.** Índice de mortalidad por cáncer ajustado por edad de 1930 a 1996 en USA. Census population. *Principles and Practice of Oncology. DeVita et al. 1997.*

Excepto en el cáncer de pulmón, la mayoría de los países desarrollados presentan una disminución en los índices de mortalidad por cáncer en los últimos 20 años. Durante este mismo periodo en países como Estados Unidos y Canadá, el índice de mortalidad por cáncer de pulmón ha aumentado más del triple, pero en los últimos 5 años, finalmente ha empezado a declinar. En los países subdesarrollados el índice de mortalidad por cáncer de pulmón continúa creciendo.



## 1.2. FACTORES DE RIESGO

Entre los *factores de riesgo* para desarrollar un cáncer de pulmón, se encuentran:

- El tabaco. La conclusión más destacada del informe de 1964 de las Autoridades Sanitarias fue el descubrimiento de que fumar cigarrillos es la mayor causa de cáncer de pulmón. En 1995, la *American Journal Thoracic* anuncia que nunca más aceptarán en sus revistas (*American Journal of Respiratory, Critical Care of Medicine, The American Journal of Respiratory Cell y Molecular Biology*) aquellos trabajos financiados por industrias del tabaco. También en 1995, el Centro de Cáncer MD Anderson, tras varios años de debate, prohibió toda investigación financiada por la industria tabacalera.

Hay una clara evidencia de la relación dosis-respuesta entre fumar y cáncer de pulmón. El riesgo de padecer cáncer de pulmón aumenta con el número de cigarrillos fumados, los años de duración del hábito, el grado de inhalación, la edad de comienzo, el contenido en alquitrán y nicotina, y el uso de cigarrillos sin filtro; y este riesgo disminuye en proporción al número de años después de dejar de fumar. La exposición ambiental al tabaco (*fumador pasivo*) también se considera un factor de riesgo en los no fumadores. Respecto a la exposición al tabaco, parece que el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de pulmón de célula pequeña tienen una relación dosis-respuesta diferente, produciendo un número mayor de estos dos subtipos histológicos.

- El sexo. No hay una clara evidencia al respecto pero parece que la mujer tiene una mayor incidencia de carcinoma de pulmón del tipo célula pequeña y del tipo adenocarcinoma, a una edad más temprana, así como una mayor susceptibilidad al tabaco en comparación con el hombre, sugiriendo una cierta disponibilidad genética (*Kreuzer, 2000*). La presencia de alteraciones genéticas (del tipo MI o LOH) en los genes que codifican las enzimas detoxificadoras *citocromo P450 (CYP1A1)* y *glutathion-S-transferasa (GSTM1)* contribuyen a este mayor riesgo. Podrían también tener un papel en este sentido los estrógenos hormonales, debido a la presencia de

receptores de estrógeno en la superficie de la célula precursora del adenocarcinoma (Dresler, 2000).

- La ocupación. Un mayor riesgo de cáncer de pulmón acompaña a la exposición a ciertos carcinógenos, como son el asbesto, el radón, el bis éter (clorometilo), los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el cromo, el níquel y los compuestos inorgánicos del arsénico. La asociación con la exposición ocupacional a estos agentes parece ser independiente del consumo de cigarrillos.
- La dieta. El papel de los nutrientes como un factor causal del cáncer de pulmón está confundido por problemas metodológicos y por los resultados conflictivos de varios estudios, pero parece que los micronutrientes antioxidantes de la dieta, como son los carotenos, las vitaminas C y E, y el selenio, juegan un importante papel en la expulsión de radicales libres producidos de manera endógena o exógena ( tabaco, disolventes...). Recientemente se ha descrito también el papel protector de las frutas y verduras en el cáncer de pulmón en las mujeres fumadoras (Feskanich, 2000).
- Predisposición genética, desarrollada en otro apartado del trabajo.

### **1. 3. DETECCIÓN SELECTIVA DEL CÁNCER DE PULMÓN (cribaje)**

Durante muchos años se ha investigado la eficacia de realizar una detección selectiva o *screening* en pacientes de alto riesgo de padecer un cáncer de pulmón (fumadores, mayores de 45 años...) para detectarlos en estadios más tempranos y disminuir así la gran mortalidad que conlleva su diagnóstico. Ninguno de los métodos utilizados hasta ahora (citología de esputo, radiografías torácicas anuales...) han conseguido disminuir la mortalidad aunque sí han logrado un diagnóstico más temprano. Actualmente se está llevando a cabo un estudio norteamericano donde aleatorizan a los pacientes de riesgo a controles anuales con TAC de baja resolución o a seguimiento, y cuyo resultado nos ayudará a definir el valor del *screening* en el cáncer de pulmón (Patz, 2000).

El carcinoma bronquial sufre un desarrollo progresivo: se inicia con una hiperplasia celular basal o metaplasia escamosa, evoluciona hacia una displasia, carcinoma in situ, y finalmente desarrolla un cáncer invasivo. Nuevas técnicas con inmunofluorescencia (LIFE del inglés *light imaging fluorescence endoscope*) son capaces de identificar lesiones superficiales en el árbol bronquial que son invisibles al broncoscopio de luz blanca de la práctica clínica habitual. Como prueba de ello, un grupo de investigadores demostraron utilizando este método LIFE y mediante microdissección, la presencia de LOH en los cromosomas *3p* y *9p* en un 37% de las muestras con displasia y en un 100% en las muestras con cáncer de pulmón invasivo (Thiberville, 1995). Así pues, alteraciones genéticas clonales que se han observado frecuentemente en los pulmones de fumadores crónicos, podrían utilizarse como marcadores precoces de cáncer de pulmón. El marcador más sensible del hábito tabáquico es la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma *3p14* (75%), aunque también se ha descrito en otros como en el cromosoma *9p21* (57%) y en el cromosoma *17p13* (18%). La detección precoz de estos marcadores moleculares mediante el método LIFE u otros, ayudaría a un diagnóstico y abordaje terapéutico más temprano.

#### **1.4. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA. HISTORIA NATURAL**

Se distinguen cuatro tipos histológicos principales de cáncer de pulmón: *carcinoma escamoso o epidermoide*, *adenocarcinoma*, *carcinoma indiferenciado de células grandes* y *carcinoma indiferenciado de célula pequeña*, aunque con frecuencia el cáncer de pulmón manifiesta dos o más patrones histológicos. La frecuencia de este hecho depende de la asiduidad del patólogo y del número de secciones examinadas. Debido a que el cáncer de pulmón de célula pequeña o microcítico (CPCP o CPM) se comporta biológicamente de una manera diferente, los otros tres tipos se agrupan en el término de cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPNCP) o no microcítico (CPNM), del que nos ocuparemos en este trabajo. El CPNM representa aproximadamente el 70-80% de todos los cánceres de pulmón.

- Clasificación histológica

El *carcinoma de células escamosas* contabiliza el 30% de todos los casos de cáncer de pulmón. Estos tumores tienden a ser de crecimiento lento y se estima que se necesitan de 3 a 4 años para el desarrollo *in situ* de un carcinoma hasta un tumor clínicamente aparente. Histológicamente se compone de láminas de células epiteliales, que pueden estar bien, pobre o moderadamente diferenciadas (Figuras 2, 3 y 4).

El *adenocarcinoma* supone el 40% de todos los casos de cáncer de pulmón en Norteamérica. La mayoría de estos tumores tienen un origen periférico aunque también pueden aparecer como tumores periféricos sobre cicatrices. El *subtipo broncoalveolar* es una entidad clínico patológica diferente. Se origina a partir de los neumocitos tipo II, y se presentan de tres formas diferentes: un nódulo solitario periférico, una enfermedad multifocal o una forma neumónica rápidamente progresiva que afecta finalmente a los dos pulmones. Parece que el adenocarcinoma tiene un pronóstico peor, estadio por estadio, que el carcinoma de células escamosas. Histológicamente estos tumores forman glándulas y producen mucina (Figuras 5, 6 y 7).

El *carcinoma de célula grande*, que incluye las variedades de célula gigante y de célula clara, es el menos frecuente de todos los tumores, constituyendo el 15% de todos los cánceres de pulmón. Su pronóstico es similar al del adenocarcinoma (Figura 8).

- Historia natural

Después de un periodo variable de tiempo como tumor primario creciendo dentro del parénquima pulmonar o de la pared bronquial, el tumor finalmente invade las vías vasculares y linfáticas, llegando así a los ganglios linfáticos de drenaje regional y a los lugares de metástasis a distancia. Ocasionalmente, pueden verse metástasis por diseminación aérea (nódulos satélites) en el parénquima pulmonar cerca del tumor primario. *Deslauriers et al* demostró que la presencia de un nódulo satélite descubierto en el acto quirúrgico, claramente separado del tumor primario pero con idéntica histología, es un factor de mal pronóstico. La supervivencia a los cinco años en

pacientes con nódulos satélites de cualquier estadio de CPNM, es de 21.6% en comparación con el 44% si no presentan nódulos.

El CPNM puede también extenderse localmente a las estructuras contiguas, incluyendo la pleura o los órganos mediastínicos y a la pared torácica o al diafragma. Una vez que se produce la invasión vascular o linfática, la propagación metastásica a cualquier órgano es común. Como se demuestra en series de autopsias realizadas, las metástasis del cáncer de pulmón de célula no pequeña se pueden localizar prácticamente en cualquier órgano. Las localizaciones más frecuentes de propagación, que son clínicamente aparentes, son el hueso, el hígado, las glándulas suprarrenales y el cerebro. No se puede explicar la alta incidencia de metástasis adrenal en el CPNM, detectada hasta en el 41% de los pacientes en la autopsia. La mayoría de las metástasis adrenales son asintomáticas y se descubren de forma accidental durante una evaluación del estadio tumoral o en la autopsia. Asimismo, las metástasis cerebrales constituyen más del 25% de las recurrencias de CPNM resecaos, y también se detectan con gran frecuencia en las autopsias. En una revisión realizada por *Lung Cancer Study Group*, el cerebro suponía aproximadamente el 20% de todas las recurrencias.

---

**Tabla 1.** Clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud del carcinoma epitelial broncogénico.

---

- I. Lesiones preinvasivas
- A. Displasia escamosa / carcinoma *in situ*
  - B. Hiperplasia adenomatosa atípica
  - C. Hiperplasia celular neuroendocrina pulmonar difusa idiopática
- II. Lesiones invasivas malignas
- A. *Carcinoma de células escamosas*
    - Variantes
      - papilar
      - célula clara
      - célula pequeña
      - basaloide
  - B. *Carcinoma de célula pequeña*
    - Variante
      - carcinoma de célula pequeña combinada
  - C. *Adenocarcinoma*
    - Acinar
    - Papilar
    - Broncoalveolar
      - No-mucinoso (célula clara / neumocito tipo II)
      - Mucinoso
      - Mixto de mucinoso y no-mucinoso, o de célula indeterminada
    - Mucosecretor
    - Adenocarcinoma con varios subtipos
      - adenocarcinoma fetal bien diferenciado
      - adenocarcinoma mucinoso
      - cistoadenocarcinoma mucinoso
      - adenocarcinoma en anillo de sello
      - adenocarcinoma de célula clara
  - D. *Carcinoma de célula grande*
    - carcinoma de célula grande neuroendocrino
    - carcinoma de célula grande combinada neuroendocrina
    - carcinoma basaloide
    - carcinoma linfoepitelioma-like
    - carcinoma de célula clara
    - carcinoma de célula grande con fenotipo rabdoide
  - E. *Carcinoma adenoescamoso*
  - F. *Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides y sarcomatosos*
    - carcinomas de células gigantes
      - carcinoma pleomórfico
      - carcinoma fusiforme
      - carcinoma de célula gigante
    - carcinosarcoma
    - blastoma pulmonar
  - G. *Tumores carcinoides*
    - Carcinoide típico
    - Carcinoide atípico
  - H. *Carcinomas tipo de glándula salivar*
  - I. *Inclasificados*

---

De WD Travis, TD Colby, B Corrin. *Histologic Typing of Lung and Pleural Tumors- The World Health Organization (WHO) Classification of Lung Cancer 1999 (rev. 10 Octubre 1998).*

---

**Figura 2.** Carcinoma escamoso bien diferenciado.

**Figura 3.** Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado

Células tumorales con cantidades variables de citoplasma y atipia nuclear moderada. Se puede apreciar cierto grado de queratinización focal.

**Figura 4.** Carcinoma escamoso pobremente diferenciado

**Figura 5.** Adenocarcinoma bien diferenciado

Glándulas bien diferenciadas con acúmulos cribiformes focales rodeados de estroma celular

**Figura 6.** Adenocarcinoma moderadamente diferenciado

**Figura 7.** Adenocarcinoma pobremente diferenciado

**Figura 8.** Carcinoma de células grandes

Células tumorales atípicas que forman grupos con necrosis central. Se aprecia la ausencia queratina o de glándulas.

## 1.5. PRESENTACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

### - Presentación clínica

Algunos pacientes debutan con una lesión asintomática descubierta por causalidad en una radiografía de tórax y son este pequeño grupo de pacientes (un 30% del total) los que pueden recibir un tratamiento quirúrgico curativo. Pero desgraciadamente, en el momento del diagnóstico un 30% ya tienen enfermedad localmente avanzada y por tanto inoperable y, el restante 40% tienen la neoplasia diseminada a distancia.

Los signos y síntomas referidos por los pacientes con cáncer de pulmón, dependen de la localización del tumor, de su extensión loco-regional, o de los efectos de la propagación a distancia (Tabla 2). El cáncer de pulmón también está asociado con síndromes paraneoplásicos con más frecuencia que cualquier otro tumor (Tabla 3).

### - Diagnóstico

En pacientes sospechosos de albergar un cáncer de pulmón, es esencial un diagnóstico preciso con confirmación histológica. La *citología de esputo* tiene un rendimiento menor del 50%, siendo mayor en tumores de crecimiento endobronquial (por ejemplo, carcinoma escamoso) que en los adenocarcinomas. La *fibrobroncoscopia* proporciona el diagnóstico en el 90% de los casos, cuando el tumor es visible endobronquialmente. En aquellos tumores no visibles, el rendimiento de los lavados y cepillados endobronquiales es de un 75% en las lesiones centrales y de un 55% en las periféricas. Cuando la fibrobroncoscopia no es concluyente y la lesión es periférica, la *punción-aspiración con aguja fina (PAAF)* tiene un rendimiento del 85%. En algunos pacientes, el diagnóstico se realiza mediante *mediastinoscopia*. Afortunadamente, la *toracotomía diagnóstica* rara vez es necesaria.

### - Estadificación

Una vez se ha hecho el diagnóstico histológico de cáncer de pulmón, es necesario hacer una evaluación de la extensión de la enfermedad. Los estudios deben incluir una

*exploración física*, una *valoración hematológica y bioquímica*, una *radiografía simple de tórax*, y una *tomografía axial computerizada (TAC)* del tórax y de la parte superior del abdomen. El uso rutinario de la *mediastinoscopia* (exploración quirúrgica transcervical del mediastino y biopsia de los ganglios linfáticos) antes de la intervención quirúrgica definitiva en el tratamiento del CPNM, permanece en continuo debate. El razonamiento de emplear la mediastinoscopia, es intentar evitar algunas toracotomías que son innecesarias cuando ya hay enfermedad en el mediastino. Durante los últimos años, el uso de *tomografía por emisión de positrones (PET)* ha adquirido un gran papel en la estadificación mediastínica. Dos recientes estudios (*Vansteenkiste, 1999; Pieterman, 2000*) han demostrado que el PET supera al TAC en la detección de enfermedad mediastínica. El uso rutinario de *TAC o RMN del cerebro* para la detección de metástasis cerebrales así como la *gammagrafía ósea* para la detección de metástasis óseas, no se ha establecido, pero probablemente no son eficaces en cuanto al coste en una enfermedad en estadio inicial. Otras modalidades diagnósticas son la *videotoracosocopia* y la *biopsia transbronquial* del mediastino, rara vez utilizadas.

La determinación del estadio clínico y patológico del cáncer de pulmón utiliza el *sistema TNM* (T, tumor primario; N, ganglionar nodal; M, metástasis) Esta clasificación fue modificada en 1997 por *Mountain*, para establecer grupos de pacientes que requiriesen modalidades terapéuticas similares y que tuvieran pronósticos semejantes (Tabla 4 y 5). Se han identificado cuatro estadios en el cáncer de pulmón, con diferencias significativas en la supervivencia a los 5 años dependiendo del estadio de la enfermedad al diagnóstico. La precisión de estos estadios en la predicción de la supervivencia ha sido confirmada por muchos autores, recientemente por *Jassem et al* en una serie de 586 pacientes intervenidos de cáncer de pulmón.

---

**Tabla 2.** Signos y síntomas comunes del cáncer de pulmón

---

*Síntomas secundarios al crecimiento central o endobronquial del tumor primario*

- Tos
- Hemoptisis
- Respiración jadeante y estridor
- Disnea por la obstrucción
- Neumonitis por la obstrucción (fiebre y tos productiva)

*Síntomas secundarios al crecimiento periférico del tumor primario*

- Dolor pleurítico por afectación de la pared torácica
- Tos
- Disnea sobre una base restrictiva
- Síndrome de absceso pulmonar por cavitación del tumor

*Síntomas relacionados con la propagación del tumor en el tórax por contigüidad o por metástasis a los ganglios linfáticos regionales*

- Obstrucción de la tráquea
- Compresión del esófago con disfagia
- Parálisis recurrente del nervio laríngeo con ronquera
- Parálisis del nervio simpático con síndrome de Horner
- Octavo nervio cervical y primero torácico con dolor cubital y síndrome de Pancoast
- Síndrome de la vena cava superior producida por obstrucción vascular
- Extensión pericárdica y cardíaca con taponamiento resultante, arritmia o insuficiencia cardíaca
- Obstrucción linfática con derrame pleural
- Extensión linfática a través de los pulmones con hipoxemia y disnea (linfangitis carcinomatosa)

*Cohen MH. Signs and symptoms of bronchogenic carcinoma. In: Straus MJ, Ed. Lung cancer: clinical diagnosis and treatment. New York: Grune & Stratton, 1977:85*

---

---

**Tabla 3.** Síndromes paraneoplásicos en pacientes con cáncer de pulmón

---

*Endocrinos*

- Hipercalcemia (hormona paratiroidea ectópica)
- Síndrome de Cushing
- Hipoglucemia
- Síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética
- Síndrome carcinoide
- Ginecomastia
- Hipercalcitonemia
- Hormona del crecimiento elevada
- Prolactina elevada, hormona folículo-estimulante, hormona luteinizante
- Hipotiroidismo

*Neurológicos*

- Encefalopatía
- Degeneración cerebelar subaguda
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva
- Neuropatía periférica
- Polimiositis
- Neuropatía autonómica
- Síndrome de Eaton-Lamberg
- Neuritis óptica

*Esqueletares*

- Dedos en palillo de tambor
- Osteoartropatía hipertrófica pulmonar

*Hematológicos*

- Anemia
- Reacciones leucemoides
- Trombocitosis / Trombocitopenia
- Eosinofilia
- Aplasia pura de los glóbulos rojos
- Leucoeritroblastosis
- Coagulación intravascular diseminada

*Cutáneos*

- Hiperqueratosis
- Dermatomiositis
- Acantosis nigricans
- Hiperpigmentación
- Eritema giratum repens
- Hipertrichosis lanuginosa acquista

*Otros*

- Síndrome nefrótico
- Hiperuricemia
- Secreción del péptido intestinal vasoactivo con diarrea
- Hiperamilasemia
- Anorexia o caquexia

---

*Adaptado de M. Maddaus, RJ Gisnberg. Diagnosis and staging. Thoracic Surgery. New York: Churchill Livingston. 1995: 671.*

---

**Tabla 4.** Sistema de clasificación del estadio tumoral TNM para el cáncer de pulmón

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

**Tabla 5.** Supervivencia según estadio en el cáncer de pulmón

	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
<i>Estadio clínico</i>					
IA	91	79	71	67	61
IB	72	54	46	41	38
IIA	79	49	38	34	34
IIB	59	41	33	26	24
IIIA	50	25	18	14	13
IIIB	34	13	7	6	5
IV	19	6	2	2	1
<i>Estadio patológico</i>					
IA	94	86	80	73	67
IB	87	76	67	62	57
IIA	89	70	66	61	55
IIB	73	56	46	42	39
IIIA	64	40	32	26	23

*Mountain CF. Chest 1997; 111: 1710-1717.*

## 1.6. FACTORES PRONÓSTICOS

Numerosos estudios clínicos han identificado varios factores pronósticos para pacientes afectados de CPNM, en un intento de identificar una terapia adecuada para determinados grupos de pacientes. En general todos ellos determinan que los principales factores pronósticos cuando la neoplasia se encuentra en un estadio temprano son el tamaño tumoral y la presencia o ausencia de invasión ganglionar linfática (clasificación TNM). Pero cuando la enfermedad se localiza en un estadio más avanzado, el estadio TNM pierde importancia a favor de otros como son el estado general o *performance status* y la pérdida de peso. También se ha valorado en numerosos estudios otros factores clínicos como son el sexo, el nivel de lactato de deshidrogenasa (LDH) en suero y el nivel de hemoglobina en sangre. El hecho de que una ubicación metastásica específica confiera una ventaja o desventaja en la supervivencia continúa siendo controvertido. Las metástasis óseas y hepáticas han sido citadas muy a menudo como predictoras de una supervivencia más corta, mientras que las metástasis de localización única tiene un mejor pronóstico.

Otros factores en investigación para intentar determinar el pronóstico incluyen:

- Ploidía, parece que los pacientes con tumores diploides sobreviven más tiempo que los de los tumores aneuploides, pero es necesario un mayor estudio para definir su importancia como factor pronóstico.
- Receptores del factor de crecimiento epidérmico, su presencia en las células de cáncer de pulmón es un hallazgo frecuente (se describe en un 60%) pero su importancia pronóstica permanece incierta.
- Antígeno del grupo sanguíneo, no ha podido confirmarse su valor en el cáncer de pulmón, pero parece que la ausencia del antígeno del grupo A confiere una peor supervivencia en pacientes afectados de cáncer de pulmón estadio I y II (*Mehdi, 1999*).
- Marcadores neuroendocrinos, que indicarían la presencia de cierto grado de diferenciación endocrina de los tumores, y por tanto una posible mayor respuesta a la quimioterapia (por similitud a los tumores de célula pequeña) como son la

- cromogranina, el CEA, la L-dopa descarboxilasa, los gránulos nucleares densos y el Leu-7, todos ellos área actual de investigación (*Graziano, 1998*).
- Otros marcadores, como el tiempo de duplicación del tumor, la invasión vascular y linfática, sí como la angiogénesis también se han implicado como factores de mal pronóstico.
  - La captación de  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-glucosa mediante el PET, se ha correlacionado con el índice de crecimiento celular y la capacidad proliferativa y por tanto como un posible factor de agresividad y de mal pronóstico (*Veselle, 2000*).
  - La expresión génica el receptor nuclear retinoico (RAR-B) en estadios iniciales se ha correlacionado también con un peor pronóstico (*Khuri, 2000*).

## 1.7. ACTITUD TERAPÉUTICA

En el cáncer de pulmón la *cirugía* y la *radioterapia* se han utilizado de manera independiente para intentar obtener el control local del tumor primario y del drenaje linfático regional. Hasta hace poco, la *quimioterapia* se había utilizado con la intención de prolongar la supervivencia libre de síntomas en los pacientes con enfermedad metastásica. Sin embargo, en los últimos 20 años, las terapias de modalidad combinada de quimioterapia, cirugía y radioterapia, se han hecho mucho más sobresalientes y han provocado una investigación más intensa. Las tres modalidades se utilizan ahora como terapia principal, y en combinación se han empleado para mejorar los intervalos libres de enfermedad y secundariamente la supervivencia de los pacientes afectos de cáncer de pulmón de célula no pequeña.

### 1.7.1. Cirugía

Cuando el tumor está limitado a un hemitórax y se puede abarcar quirúrgicamente, la cirugía proporciona la mejor oportunidad de curación. En los estadios I y II, cuando el tumor no se ha extendido más allá de los ganglios linfáticos regionales, casi siempre se

puede realizar una escisión completa. La controversia aparece en el manejo de la enfermedad en estadio IIIA que se comentará en el siguiente apartado. Excepto en casos aislados, la enfermedad en estadio IIIB, en virtud de la extensión ganglionar linfática contralateral (N3) o de la invasión del tumor primario de estructuras vitales (T4), indica la inoperabilidad con una probabilidad de éxito baja después de la cirugía. Igualmente, el cáncer de pulmón estadio IV que ha metastatizado hacia órganos distantes está generalmente más allá del alcance de la escisión quirúrgica. Sin embargo, se ha producido interés en la extirpación del tumor primario así como de un foco metastático solitario (adrenal o cerebral, fundamentalmente). En pacientes seleccionados, esto puede provocar un mejor control sin enfermedad a largo plazo.

Con unas mejores técnicas quirúrgicas y anestésicas y una mejor asistencia perioperatoria, el índice de mortalidad postoperatoria ha disminuido considerablemente durante los últimos 50 años. Hoy en día, la neumonectomía puede efectuarse con un índice de mortalidad menor del 6%, la lobectomía con menos del 3%, y las resecciones más pequeñas con una mortalidad del 1% o incluso menor. Estos índices de mortalidad están afectados significativamente por la edad del paciente, el estadio de la enfermedad, extensión de la resección, y la experiencia del equipo quirúrgico.

Un tema contenido es el trasplante pulmonar. Aunque el trasplante de pulmón es técnicamente factible y conceptualmente muy interesante, en la práctica se ha demostrado que el tumor original recidiva en los pulmones del donante receptor del trasplante con las mismas características histológicas y moleculares que las originales (*Garver, 1999*).

### **1.7.2. Radioterapia**

La radioterapia en el cáncer de pulmón también ha experimentado cambios importantes en un corto período de tiempo en cuanto a la técnica y conformación de imágenes (aceleradores lineales, conformación individualizada, planificación tridimensional y escalamiento de dosis), la selección del paciente, y los principios radiobiológicos. Los

últimos esfuerzos para aumentar la dosis y mejorar el control local han tenido algún éxito utilizando el hiperfraccionamiento, el fraccionamiento acelerado, o la radioterapia acelerada hiperfraccionada (CHART). La toxicidad local es el factor limitante y está relacionado fundamentalmente con la dosis por fracción y la dosis total (*Choi, 2001*).

Los pacientes remitidos para considerar una intervención radioterapéutica primaria, suponen de un 10 a 15% de los que presentan un tumor en estadio I o II médicamente inoperables. Estos pacientes reciben dosis de 65 Gy o mayores con intención de erradicar el tumor primario y los ganglios linfáticos visiblemente anormales. Los pacientes remitidos suponen también de un 30 a 40% con un cáncer no resecable localmente avanzado -estadio IIIA o IIIB-, y un 40 a 50% con una enfermedad en estadio IV para paliación de sintomatología.

### 1.7.3. Quimioterapia

En líneas generales, en el manejo global del cáncer de pulmón, el uso de *quimioterapia adyuvante* puede considerarse tras una resección radical en los estadios I y II, debe administrarse *preoperatoriamente* en pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadio III), debe utilizarse en *combinación con radioterapia* en pacientes con enfermedad localmente avanzada inoperable (IIIB) y como tratamiento *único* en pacientes con estadio IV.

La quimioterapia en el estadio IV del cáncer de pulmón está universalmente aceptada pues ha demostrado que prolonga la supervivencia cuando se compara con BSC (del inglés *best support care* o mejor tratamiento de soporte). El uso de quimioterapia con cisplatino se reveló como un factor pronóstico independiente en un análisis de 2.531 enfermos con CPNM estadio IV tratados en el *Southwest Oncology Group* (SWOG). Dicho análisis confirmó el beneficio de la quimioterapia sistémica en este grupo de pacientes, tanto en supervivencia (incremento de 10% en la supervivencia al año) como en la calidad de vida del enfermo.

Hasta la fecha no hay un régimen quimioterápico estándar, pues la mayoría de los fármacos tienen una actividad moderada en el CPNM (Tabla 6). Las respuestas completas a un agente único son extremadamente raras y tienen una duración de respuesta corta. Debido a ello se investigó la combinación de varios agentes quimioterápicos para mejorar los índices de respuesta, y la mayoría de las combinaciones utilizan el cisplatino con otro agente asociado: paclitaxel/cisplatino, gemcitabina/cisplatino, vinorelbina/cisplatino, paclitaxel/carboplatino, y cisplatino/docetaxel entre los esquemas más frecuentes. Estos regímenes son probablemente igual de eficaces y aunque tienen diferentes perfiles de toxicidad, estas diferencias no tienen necesariamente que influir en la calidad de vida del paciente. El uso de segundas líneas de quimioterapia en pacientes refractarios o sensibles a una línea previa ha sido revisado recientemente por *Shepherd et al*, quien ha demostrado que la quimioterapia de segunda línea produce una mejoría en la supervivencia, así como en la calidad de vida respecto a aquellos pacientes no tratados. Por tanto, su falta de utilización, tampoco está justificada hoy día.

**Tabla 6.** Medicamentos activos en el cáncer de pulmón de célula no pequeña

Antes de 1990		Desde 1990	
<i>Agente</i>	<i>Respuesta (%)</i>	<i>Agente</i>	<i>Respuesta (%)</i>
Cisplatino	15-20	Docetaxel	23-38
Carboplatino	9-20	Paclitaxel	21-24
Etopósido	5-15	Irinotecan	33
Mitomicina C	20	Vinorelbina	12-33
Vinblastina	16-25	Gemcitabina	20-23
Vindesina	16-25	Edatrexate	0-21
Ifosfamida	20	Topotecan	0-24

El gran desarrollo de la industria farmacéutica ha permitido ofrecer un gran número de agentes farmacológicos prometedores en el tratamiento contra el CPNM. La mayoría de ellos son en el momento actual objeto de estudios aleatorizados, por ejemplo:

- *Tirapazamina*, una citotoxina hipóxica
- *Trastuzumab*, un anticuerpo monoclonal contra factores de crecimiento
- *Bryostatín*, con actividad de modulador de la señal de transducción
- *Marimastat*, inhibidor de la enzima metaloproteinasa
- *Factor de crecimiento endotelial antivascular*
- *Add-p45*, como terapia génica
- *ZD 1839*, inhibidor de la transmisión de señales
- *BMS 184476*, un derivado del taxano con efecto estabilizador sobre la tubulina

Otra alternativa de tratamiento es la quimioterapia secuencial, basada en los modelos de *Day* y de *Norton & Simon*. El primero propone la existencia de varias subpoblaciones tumorales con diferentes patrones de quimiosensibilidad y resistencia, y el empleo de quimioterapia secuencial permitiría eliminar la resistencia. Los segundos autores se basan en un diferente crecimiento tumoral: las células sensibles crecerían más rápidamente y formarían la población dominante, mientras que las células resistentes crecerían más lentamente y constituirían una pequeña muestra de la población tumoral. Por tanto un régimen de inducción seguido rápidamente por un régimen efectivo de consolidación obtendría óptimos resultados.

#### **1.7.4. Tratamiento combinado en estadios localmente avanzados**

La combinación de quimioterapia con radioterapia intenta reducir el tamaño del tumor primario para mejorar su control local. También la quimioterapia puede actuar sinérgicamente con la radioterapia como radiosensibilizador o mostrando una citotoxicidad aditiva. Pero además, la quimioterapia puede eliminar o retrasar la aparición de metástasis a distancia. Esta combinación puede sucederse de tres maneras:

- a) *Quimioterapia neoadyuvante e irradiación posterior*. Las conclusiones que podemos obtener de los múltiples ensayos publicados son de lo más variadas. Por ejemplo, el primer ensayo aleatorizado que demostró una mejoría en la supervivencia del CPNM avanzado con la asociación de quimioterapia y

radioterapia frente a radioterapia exclusiva se publicó por *Dillman et al* en 1990. Realizado sobre 155 pacientes con estadio III tratados con quimioterapia (cisplatino y vinblastina) y radioterapia secuencial (40Gy). El brazo de quimioradioterapia mostró una mejoría significativa de la mediana de supervivencia (13,8 meses versus 9,7 meses) y de la supervivencia a los cinco años (17% frente a 6%). Otros estudios posteriores publicados por diferentes autores, han demostrado que la irradiación torácica aumenta significativamente el número de supervivientes a largo plazo cuando se compara con quimioterapia exclusiva. Sin embargo, en 1988 *Mattson et al* en una serie con 238 pacientes aleatorizados a recibir radioterapia sola o combinada con CAP (ciclofosfamida/doxorubicina/platino) no pudieron demostrar una mejoría ni en el control local ni en la supervivencia. Este estudio ha sido criticado por utilizar dosis inadecuadas de los fármacos, y ello probablemente ha contribuido a la ausencia de beneficio.

- b) *Quimioradioterapia concurrente*. Un meta-análisis realizado sobre 2.589 pacientes confirma que la asociación de quimioterapia y radioterapia de manera concomitante, mejora la supervivencia de los pacientes con CPNM localmente avanzado no quirúrgico, reduciendo el riesgo relativo de muerte en un 12% el primer año, un 13% el segundo año y un 17% el tercer año.
- c) *Quimioradioterapia concurrente como tratamiento neoadyuvante*. No existe un acuerdo total sobre el beneficio de la quimioradioterapia de inducción con respecto a cirugía exclusiva. Algunos estudios muestran una tendencia al aumento de supervivencia con el tratamiento preoperatorio y un alto índice de reseccabilidad, mientras que otros consideran una toxicidad inaceptable y sin beneficio alguno.

## **1.8. ALGUNOS ASPECTOS SOBRE EL ESTADIO I-III DEL CPNM**

Teniendo en cuenta que más del 75% de los pacientes con cáncer de pulmón en estadios iniciales recaen a distancia, parece lógico pensar que la resección de la enfermedad

macroscópicamente visible es insuficiente como tratamiento para la mayoría de los pacientes afectados de CPNM. Es el estadio I-III A del que nos ocupamos en este trabajo, y el que más ha sido objeto de debate en relación con su tratamiento.

El uso de la quimioterapia adyuvante en este estadio para intentar mejorar los resultados obtenidos con la cirugía, es muy controvertido. El reciente estudio de *Keller et al* realizado en pacientes intervenidos con estadios II y III A de CPNM no muestra beneficio alguno de la quimioterapia adyuvante. Tras la cirugía, el grupo control recibió radioterapia y el grupo de estudio quimioradioterapia (esquema con cisplatino y etopósido), y no logra demostrar diferencias significativas en cuanto a supervivencia o recaída local. Un meta-análisis llevado a cabo por *Non-Small-Cell Lung Cancer Collaborative Group* entre los años 1965 y 1991, estudió 14 ensayos que emplearon quimioterapia adyuvante (dividido en tres grupos, 5 estudios que utilizaban agentes alquilantes, 8 con regímenes basados en cisplatino y 4 con otros fármacos) y su efecto en la supervivencia, y únicamente los estudios con esquemas basados en cisplatino mostraron un cierto beneficio. En la Tabla 7 se resumen algunos de los ensayos que evalúan el papel de la quimioterapia adyuvante en el cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadios tempranos:

Desde los años 70, la radioterapia adyuvante se empleaba de modo rutinario en pacientes con afectación ganglionar hiliar (N1) o mediastínica (N2), así como en aquellos con márgenes de resección quirúrgicos afectados. Actualmente su utilización es más discutida, a raíz de varios estudios aleatorizados que no han conseguido demostrar un beneficio claro en la supervivencia en estos pacientes tras recibir radioterapia adyuvante. Un meta-análisis llevado a cabo por el *grupo PORT* sobre 9 estudios con 2.128 pacientes con estadios I-III A de CPNM aleatorizados a recibir radioterapia adyuvante o no, demostró un efecto negativo de la misma con un mayor riesgo de muerte (21% mayor), una disminución de la supervivencia (detrimento del 7% a los dos años) y un efecto perjudicial en la recaída tanto local como a distancia. Por tanto, el valor de la irradiación postoperatoria se halla actualmente controvertido. En la Tabla 8 se sintetizan algunos de los estudios más significativos al respecto.

En resumen, estos y otros muchos estudios demuestran un papel controvertido de la radioterapia adyuvante en el estadio I-III A del CPNM, con importantes efectos secundarios que en muchos casos ocasiona un detrimento en la supervivencia. La planificación tridimensional y la disminución del campo de volumen pulmonar de irradiación, son aspectos fundamentales a desarrollar en este sentido.

Pero desgraciadamente, ni la radioterapia ni la quimioterapia adyuvante han logrado un impacto en la supervivencia de estos pacientes afectados de CPNM estadio I-III A. Todos los estudios realizados coinciden y confirman que a pesar de una cirugía radical, dos tercios de las recaídas ocurren a distancia, por lo que es necesario investigar un tratamiento efectivo para este grupo de pacientes. En este sentido, la terapia de inducción o neoadyuvante está en investigación desde hace muchos años (*Rosell, 1994*) como tratamiento del CPNM localmente avanzado (estadios III A y III B). En aquellos tumores muy próximos a estructuras vitales en los que se prevé una cirugía no radical de inicio, y en aquellos con afectación ganglionar clínica (N2), la radioterapia se ha utilizado de manera preoperatoria desde los años 70. Sin embargo, tres estudios aleatorizados en fase III no consiguieron demostrar resultados positivos (*Bloedorn, 1961; Shields, 1970; Warram, 1975*). Hacia los años 80, se empezó a diseñar estudios con quimioradioterapia preoperatoria en pacientes con estadio clínico IIIAN2 obteniendo mejores resultados en supervivencia y en índice de reseccabilidad. Fue *Martini et al* quien introdujo en 1988 el concepto de quimioterapia neoadyuvante en pacientes N2, con una mejora en la supervivencia y en la reseccabilidad. Desde entonces se han desarrollado un gran número de estudios y ensayos con quimioterapia neoadyuvante, en pacientes con estadio avanzado IIIAN2 (Tabla 9) que han mostrado índices de respuesta de 46-78% e índices de resección de 51-68%. La respuesta patológica completa varía entre 0-11% y el índice de mortalidad postoperatoria entre 0 y 17%. La supervivencia varía entre los distintos estudios, entre 12 y 21 meses. Todos estos regímenes de inducción muestran un alto índice de respuesta radiológica, alto índice de reseccabilidad y una mejoría en la supervivencia en los pacientes con resección completa. El *downstaging* patológico se ha asociado con una mejor supervivencia, y fue el único factor pronóstico en un análisis multivariado realizado por *Albain et al*. En las Tablas 9 y 10 se refieren algunos de los estudios comentados. Asimismo, desde la

vertiente clínica también se constata que la aplicación de quimioterapia neoadyuvante es más factible que la administración de quimioterapia postoperatoria. Un ejemplo reciente, el estudio BLOT ilustra dicho aspecto: el 97% de los enfermos completaron la quimioterapia neoadyuvante frente al 38% cuando ésta se administra de forma adyuvante (*Pisters, 1999*).

Debido al beneficio que produce la quimioterapia en el estadio localmente avanzado, se están desarrollando actualmente muchos ensayos que valoran el papel de la quimioterapia neo y adyuvante en los estadios iniciales del cáncer de pulmón. Basados en los resultados del estudio realizado por *Pisters et al*, donde trataron a 94 pacientes con mediastinoscopia negativa y con estadios T2N0, T1-2N1 y T3N0-1, con 2 ciclos de quimioterapia de inducción (paclitaxel y carboplatino) seguido de cirugía y después de 3 ciclos adicionales, con un 56% de respuestas y un 84% de resección quirúrgica completa, en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, se ha iniciado un protocolo denominado NATCH (de las siglas *NeoAdjuvant Taxol Carboplatin Hope*), en el que se compara por primera vez el tratamiento neoadyuvante versus adyuvante versus observación, en paciente con estadio I-II de CPNM. En este protocolo se estudia además la presencia de anomalías genéticas y su implicación. Los resultados de este ensayo contestarán muchas de las preguntas anteriormente mencionadas.

Como resumen se podría decir que en conjunto, los estudios de tratamiento combinado han demostrado: (1) el tratamiento bi o trimodal es mejor que la cirugía sola en los estadios IIIA/IIIB; (2) los pacientes que responden parcial o completamente al tratamiento de inducción (*downstaging*) tienen una mejor supervivencia; (3) pacientes que presentan N2 en el momento de la cirugía tienen una mala supervivencia a los 5 años (< 10%); y (4) la resección incompleta rara vez es curativa. Actualmente, el uso de nuevos agentes quimioterápicos así como una mejoría en la administración del tratamiento, un mayor número de pacientes y una mayor definición de los grupos de pacientes a la hora de incluirlos en ensayos clínicos, permitirá en los próximos años aclarar estas cuestiones.

**Tabla 7.** Ensayos de quimioterapia adyuvante en estadio I-IIIa de CPNM

<i>Autor</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Estadio</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Resultado</i>
1) Holmes et al (LCSG), 1986	CAP vs. BCG+Lev	II, III (adenocarcinoma)	141	Positivo
2) Lad et al (LCSG), 1988	RT vs. CAP + RT	II y III con cirugía incompleta	172	Positivo
3) Feld et al (LCSG), 1993	CAP vs. Placebo	I, IIA	283	Negativo
4) Figlin et al (LCSG), 1994	CAP vs. Placebo	II, III	200	Negativo
5) Dautzenberg et al, 1995	RT vs. COPAC+RT	I, II, III	267	+/-
6) Keller et al, 2000	CE + RT vs. RT	II, IIIA	488	Negativo

BCG: Bacillus Calmette-Guérin; CAP: ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatino; RT: radioterapia. LCSG: Lung Cancer Study Group. COPAC: ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatino, vincristina, CCNU; CE: cisplatino, etopósido.

**Tabla 8.** Ensayos clínicos con radioterapia adyuvante en estadio I-IIIa de CPNM

<i>Autor</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Estadio</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Resultado</i>
1) LCSG, 1986	RT vs. Control	II, III	210	+/-
2) Dautzenberg et al, 1999	RT vs. Control	I, II, III	728	Negativo
3) Park JH et al, 1999	RT vs. MVC	II	57	Negativo

MVC: mitomicina, vinblastina, cisplatino.

LCSG: Lung Cancer Study Group

**Tabla 9.** Estudios aleatorizados de cirugía vs. quimioterapia preoperatoria y cirugía, seguidos de radioterapia en CPNM estadio IIIA

<i>Autor</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Nº ptes</i>	<i>Nº reseçados</i>	<i>SV media (meses)</i>	<i>SV 3 años</i>	<i>SV 5 años</i>	<i>Índice de respuesta</i>	<i>Índice de resección</i>
Pass <i>et al</i> , 1992	Cirugía	14	12	16	21	NR	—	86
	vs. EP + Cir	13	11	29	46	NR	62	85
Rosell <i>et al</i> , 1994	Cirugía	30	27	10	5	0	—	90*
	vs. MIC+Cir	30	23	22	20	17	60*	85*
Roth <i>et al</i> , 1994	Cirugía	32	21	11	19	15	—	66*
	vs. CEP+ Cir	28	17	64	43	36	35*	61*

CEP: ciclofosfamida, etopósido, cisplatino. MIC: mitomicina, ifosfamida, cisplatino. Cir: cirugía. EP: etopósido, cisplatino. \*: estadísticamente significativo. NR: no recogido

**Tabla 10.** Quimioradioterapia preoperatoria en CPNM localmente avanzado

<i>Autor</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Índice de respuesta(%)</i>	<i>Resección completa (%)</i>	<i>Downstaging (%)</i>	<i>Supervivencia mediana (meses) estadios IIIA/IIIB</i>
Albain <i>et al</i> .	126	59	71	39	13/17
Choi <i>et al</i> .	42	74	84	67	25/-
Eberhart <i>et al</i> .	94	64	53	49	20/18
Thomas <i>et al</i> .	54	69	63	-	25/17

## 1.9. GENERALIDADES SOBRE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO.

El gran avance en la investigación molecular, su papel en el cáncer de pulmón y su potencial aplicación en la práctica clínica podría ser la traducción de la expresión norteamericana *translational research*; expresión utilizada cada vez más por el oncólogo médico en la práctica clínica diaria.

### 1.9.1. Aspectos moleculares del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es un proceso gradual de múltiples fases de evolución donde la selección de poblaciones de células anormales evoluciona de forma clonal con ganancia de una función de crecimiento selectiva sobre las células normales por acumulación de daños genéticos que afectan diversos oncogenes y genes supresores tumorales. En la Tabla 11 se citan las alteraciones más estudiadas en el CPNM.

**Tabla 11.** Algunas alteraciones genéticas y moleculares en el cáncer de pulmón

<i>Genes</i>	<i>Mutación</i>	<i>Frecuencia de expresión (%)</i>		<i>Implicaciones clínicas</i>
		<i>CPNM</i>	<i>CPM</i>	
<i>Oncogenes</i>				
• <i>K-ras</i>	Mutación puntual (codón 12)	30	ND	Peor supervivencia y pronóstico
• <i>MYC</i>	Sobreexpresión de ADN amplificado	10	10-40	Peor supervivencia en CPM
• <i>c-erbB-2</i>	Aumento de expresión	25	ND	Relacionado en estadios iniciales y a peor pronóstico en adenocarcinomas
• <i>BCL-2</i>	Expresión de la proteína	25	ND	Mejor supervivencia
<i>Genes supresores tumorales</i>				
• <i>3p</i>	Deleción	50	90	Indeterminado
• <i>RB</i>	Deleción, alteración en la expresión de la proteína, y fosforilación	15	>90	Correlación con el estadio (a > expresión > estadio)
• <i>p53</i>	Deleción, mutación puntual, y sobreexpresión	50	80	Indeterminado
• <i>p16<sup>INK4A</sup></i>	Expresión de la proteína	60	ND	Acontece en estadios avanzados

ND= no descrito

a) Alteraciones cromosómicas e implicaciones

En general, los tumores sólidos presentan un número inestable de cromosomas y un sinnúmero de anomalías en el ámbito cromosómico (deleciones, duplicaciones, translocaciones...). Las alteraciones más frecuentes en el cáncer de pulmón corresponden a pérdidas de material genético o deleciones. Varias regiones cromosómicas en cáncer de pulmón están implicadas: 1p, 2p, 3p, 3q, 5p, 8q, 9p, 10q, 11p, 17p y 17q.

La alteración citogenética descrita con mayor frecuencia en el cáncer de pulmón (hasta un 50% en CPNM) es la pérdida del *brazo corto del cromosoma 3* o *3p* (Kok, 1987). En la región *3p21* se halla mapeado un gen del tipo reparador, el *hMLH1*, el cual está involucrado en la aparición de fenómenos de inestabilidad genómica. También se encuentran en esta región tres genes que codifican para unas proteínas enzimáticas degradadoras de otras proteínas intracelulares (*APH*, *ACY1*, *UBE1L*) y el gen recientemente clonado *FHIT* (*fragile histidine triad*), cuya pérdida produciría una estimulación de la síntesis y proliferación del ADN (Lukeis, 1990). Otras regiones que muestran pérdidas de material genético son el cromosoma *8p* (*21.3-22*) en un 50% de los tumores, la pérdida en *9p*(*21-22*) y la pérdida del cromosoma *15p* en un 67% de las muestras tumorales. También en el cromosoma *5q21*, que contiene los genes supresores tumorales *MCC* y *APC*, y cuya pérdida de heterocigosidad ha sido descrita recientemente por Sánchez-Céspedes *et al* como una alteración genética frecuente y con mayor tendencia a presentarse en estadios localmente avanzados, sugiriendo su papel como factor pronóstico. Igualmente ocurre con los cromosomas *13q* y *17p*, que contienen los genes supresores tumorales del retinoblastoma o *Rb* y de *p53* respectivamente.

La *telomerasa*, enzima ausente en las células somáticas de los adultos, es responsable del mantenimiento de la longitud de los telómeros en las células en división, y es esencial para la replicación continuada de las células. Los telómeros, en los extremos de los cromosomas, están constituidos por un número variable de unidades repetitivas. Esta enzima se encuentra activada de manera fisiológica en las

células germinales y embrionarias, pero también se encuentra activada en el 85% de los tumores humanos y en un 80% de los tumores de pulmón (Hiyama, 1995). Un posible método para impedir el crecimiento tumoral podría ser la inhibición de la telomerasa.

b) Oncogenes alterados en el cáncer de pulmón

Los oncogenes intervienen directamente en la regulación del crecimiento y de la división celular; un aspecto fundamental de los mismos es su carácter dominante, por lo que una sola mutación en una de las dos copias del gen puede provocar la transformación de la célula oncogénica. Se ha estudiado la presencia de mutaciones en:

- *Oncogenes de la familia ras (H-ras, K-ras y N-ras)*, juegan un gran papel en la transición de señal y proliferación celular. Diversos estudios realizados sobre muestras tumorales quirúrgicas de pulmón han mostrado la presencia de mutaciones puntuales casi exclusivamente en el subtipo de adenocarcinomas (en un tercio de los mismos), aunque su presencia en otros tipos histológicos también está descrita. El primer estudio que correlacionó el papel del oncogen *ras* con la supervivencia en CPNM avanzado fue realizado por Mitsudomi, que lo asoció con un peor pronóstico. A partir de aquí el papel de las mutaciones del oncogen *k-ras* en el pronóstico de los pacientes afectos de cáncer de pulmón, ha sido estudiado por varios autores pero no está esclarecido por el momento (Rosell, 1993, Slebos, 1990, Nelson, 1999; Graziano, 1999 y Schiller, 2001).
- *Oncogenes myc (C-myc, N-myc y L-myc)*, implicados en la transcripción de señal y en la proliferación y diferenciación celular. La sobreexpresión de la familia de genes *myc*, tiene lugar prácticamente en la totalidad de los tumores microcíticos y en determinada proporción de tumores no microcíticos.
- *Oncogenes jun y fos*, estos genes están expresados en células del epitelio bronquial y en líneas celulares de pulmón, pero su función tanto en la generación como en el desarrollo del cáncer de pulmón no está del todo clara.

c) Receptores de factores de crecimiento

Un suceso frecuente en los cánceres humanos es la amplificación de genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores, que por mecanismos autocrinos o paracrinos, estimulan el desarrollo de las células tumorales. Estos genes codifican para proteínas receptoras de membrana que guardan cierta homología con los receptores tirosín-kinasa de los factores de crecimiento. El gen *c-erbB-1* codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF del inglés *epidermal growth factor*) mientras que el *c-erbB-2*, también conocido como HER-2/*neu* lo hace para otro receptor estructuralmente muy similar al primero. La sobreexpresión de este último detectada mediante inmunohistoquímica se ha relacionado con una peor supervivencia en los enfermos con CPNM (*Kern, 1990*) incluso con un incremento de la capacidad metastásica del tumor (*Yu, 1994*).

El gen *BCL-2* regula la muerte celular, prolonga la vida de las células no cíclicas e inhibe la apoptosis de las células cíclicas. Su expresión en tumores de pulmón ha sido estudiada en varias ocasiones. *Pezzella et al* demostró en un grupo de pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón, que la supervivencia a los cinco años era mejor para aquellos pacientes que expresaban *BCL-2* (78% versus 48%,  $p < .05$ ).

d) Genes supresores tumorales

Son secuencias génicas que codifican para proteínas cuya función es el control del crecimiento y de la proliferación celular. Precisan de dos mutaciones para poder activar la oncogénesis, y por ello se llaman también “oncogenes recesivos”. Dos genes importantísimos en el cáncer de pulmón son:

- El *gen del retinoblastoma (Rb)*, localizado en el cromosoma 13 (*13q14.11*), que codifica para una proteína nuclear que interviene en los procesos de regulación del ciclo celular durante la fase G0/G1 de la mitosis. La mayoría de los tumores microcíticos de pulmón tienen ausencia o alteraciones en la proteína (más del 95%) mientras que una pequeña porción de tumores no microcíticos están afectados.
- El *gen p53*, es una fosfoproteína nuclear codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (*17p13.1*). Las alteraciones genéticas detectadas en

este gen son las más frecuentes en todos los cánceres humanos. Tiene capacidad de unión específica con el ADN, y tiene funciones activadoras de la transcripción. Una vía crucial en la que también interviene el *p53* es la inducción del proceso de muerte celular programada o *apoptosis*, a través de la transactivación de genes como *p21*, *BAX*, y *GADD45*. El gen *p53* puede actuar como oncogen dominante cuando se haya mutado, o como gen supresor tumoral cuando no está alterado. La presencia de mutaciones de *p53* en cáncer de pulmón es muy elevada (casi llega al 50% en CPNM, y es inferior al 90% en CPM). Las mutaciones de *p53* pueden ser de todo tipo, desde grandes deleciones hasta mutaciones puntuales tipo *missense* o *null*, y la influencia de éstas no está bien definida. En el cáncer de pulmón, la más frecuente es una transversión de GC a TA, y se relaciona con el tabaco. *Mitsudomi et al* han mostrado en un meta-análisis realizado recientemente sobre 45 publicaciones basadas en el factor pronóstico de *p53* en pacientes intervenidos de cáncer de pulmón, que la sobreexpresión o mutación del gen *p53* es un indicador de mal pronóstico, especialmente en el subtipo histológico adenocarcinoma.

### 1.9.2. Inestabilidad genética y cáncer de pulmón

La inestabilidad genética es muy diferente del polimorfismo presente en el cáncer de pulmón. El polimorfismo consiste en una serie de cambios que heredamos en la estructura del ADN y que normalmente son neutros cuando suceden en zonas del ADN que no se traducen, o son a menudo benignos cuando afectan a la función de genes benignos como aquellos que determinan el color de los ojos, el color del pelo... Estas versiones alternativas de un gen se llaman *alelos*. La frecuencia del polimorfismo en un gen varía entre  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$  por cada generación. Esto significa que una de cada 10 personas ha adquirido un nuevo alelo de un particular gen de uno de sus padres. Rara vez, un polimorfismo produce un alelo que origina un defecto fatal o aumenta la susceptibilidad a una enfermedad en particular, en cuyo caso se considera una mutación.

La presencia de inestabilidad genética en el cáncer de pulmón es controvertida. El cromosoma *3p*, diana más importante para este tipo de alteración, se ha presentado por diversos autores como una alteración propia de los estadios iniciales de la neoplasia

(Miozzo, 1996 y Rosell, 1997) y otros trabajos señalan este fenómeno como propio de estadios invasivos y metastáticos del cáncer de pulmón (Adachi, 1995).

### **1.9.3. Implicaciones clínicas de la biología molecular en el cáncer de pulmón. Diagnóstico molecular.**

Más allá de los aspectos histopatológicos conocidos sobre el cáncer de pulmón, el mayor conocimiento de las alteraciones genéticas y su aplicación en la práctica clínica del oncólogo médico (*translational research*) permitiría identificar aquellos enfermos con elevado riesgo de padecer un cáncer de pulmón o bien de presentar una recidiva tumoral en aquellos que ya lo presentan, y así poder decidir la estrategia más adecuada en cada paciente.

Los diferentes estudios sobre la detección precoz molecular de lesiones genéticas se han realizado tanto en pacientes con cáncer de pulmón como en individuos fumadores no afectados de neoplasia. Hasta la fecha, el diagnóstico precoz molecular en el cáncer de pulmón requiere siempre de algún tipo de muestra biológica, lo que supone cierta dificultad en su obtención. Aunque el esputo es fácil de obtener, la mayor parte de las veces está contaminado por una gran cantidad de células que enmascaran las pocas células tumorales que puedan haber. Igualmente ocurre con los lavados y cepillados broncoalveolares. Otro método empleado para la detección precoz del cáncer de pulmón consiste en la detección de respuestas inmunes contra productos proteicos mutados de oncogenes o genes supresores tumorales. En el suero de pacientes con cáncer de pulmón se han detectado anticuerpos *anti-p53* en un 15% de los mismos (Winter, 1992). También se ha demostrado que entre un 40 y 50% de los enfermos de cáncer de pulmón desarrollan anticuerpos que reaccionan contra proteínas propias obtenidas de extractos celulares de sus tumores. Sin embargo, ocurre que pacientes con grandes tumores no producen anticuerpos de este tipo. Por otro lado, los estudios realizados hasta la fecha, manejan pacientes con enfermedad clínica evidente, por lo que es difícil determinar su papel en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.

#### **1.9.4. Terapia génica en el cáncer de pulmón**

La terapia génica, la terapia antisentido, los anticuerpos monoclonales, los modificadores biológicos de respuesta y los agentes que estimulan la apoptosis están en continuo estudio como un método nuevo de tratamiento contra el cáncer de pulmón.

La terapia génica consiste en la introducción de un gen sano en una célula tumoral que lo tiene mutado o inexistente, de manera que la célula pueda recuperar la función de dicho gen. La terapia génica transfiere el gen defectuoso a la célula, y lo hace a través de vectores víricos (retrovirus, adenovirus...) o a través de otras técnicas como son las vesículas liposómicas, la coprecipitación con fosfato cálcico, o la electrocorporación (Roth, 1996). En un ensayo reciente en fase I (Mosca, 2000), nueve pacientes con recaída de CPNM y que presentaban mutación del gen *p53*, fueron tratados con una inyección local del retrovirus que contenían la forma salvaje (*wt*) de *p53*. Se observó regresión tumoral en tres pacientes y enfermedad estable en otros tres, sin toxicidad secundaria, aunque el seguimiento fue de tan sólo 5 meses.

#### **1.10. DETECCIÓN DEL ADN TUMORAL EN SANGRE PERIFÉRICA.**

La presencia de ADN tumoral en el suero de los pacientes neoplásicos, es de extrema importancia por la posibilidad que ofrece de detectar alteraciones genéticas que se desarrollan en la evolución del tumor en una muestra fácilmente accesible como es la sangre periférica. El concepto no es nuevo, pues ya en 1869, *Ashworth* detectó en sangre periférica la presencia de células que se parecían a aquellas observadas en la autopsia de pacientes neoplásicos. Sin embargo, ha sido durante las últimas dos décadas cuando se han desarrollado técnicas (inmunohistoquímica, RT-PCR y PCR fundamentalmente) que han permitido la detección de una célula tumoral entre  $10^{5-6}$  células sanguíneas. Las metodologías más utilizadas hoy en día para detectar el ADN circulante son los análisis de microsatélites, la hipermetilación y la detección de oncogenes.

El primer análisis de microsatélites de ADN tumoral circulante, se realizó en 21 pacientes afectos de cáncer de pulmón microcítico, observándose que 16 (76%) presentaban alteraciones alélicas o pérdidas de heterocigosidad. También se detectó en el 29% de una serie de 21 pacientes afectos de cáncer de cabeza y cuello. Más recientemente, *Sozzi et al* han detectado la presencia de alteraciones de microsatélites en el ADN plasmático en el 43% de los pacientes afectos de CPNM estadio I, y hasta en el 45% de tumores pulmonares que tienen un diámetro máximo de 2 cm.

La hipermetilación y concretamente la del gen *p16*, se ha detectado tanto en tumores primarios (41%) como en el ADN del suero (33%) de pacientes con CPNM. La presencia del gen *p53* también se ha detectado en el plasma de pacientes afectas de cáncer de mama.

Por tanto, la evidencia se acumula respecto al hecho de que los tumores en estadios precoces liberan células tumorales al torrente sanguíneo. Sin embargo la historia natural de estas células, su habilidad para establecer metástasis, y su papel en el desarrollo de futuras recaídas es incierto. Los estudios mencionados y otros, han demostrado que es posible mediante métodos moleculares la detección de estas células circulantes, o como mínimo, de algún producto celular resultante de la destrucción celular como son el ADN o las proteínas tumorales. Según el método de detección, la presencia de estas células tumorales en sangre está descrita entre un 0 y 27% si se utiliza la PCR y entre un 0 y 5% utilizando la inmunocitoquímica (Figura 9). De esta manera, a partir de la sangre se puede detectar la existencia de células circulantes, mientras que en el suero de las muestras sanguíneas pueden detectarse moléculas libres procedentes del tumor, como el ADN, el cual seguiría presentando las mismas alteraciones genéticas.

Varios estudios posteriores han intentado correlacionar la presencia de células tumorales o bien las alteraciones genéticas de las mismas con el pronóstico del paciente afecto de cáncer. En 1996, *Pantel et al* detectaron la presencia de células con tinción positiva para citokeratina en la sangre del 54% (38/70) de los pacientes afectos de CPNM sin afectación ganglionar mediastínica, y demostraron un efecto negativo en la supervivencia. En otro estudio, se demostró la afectación ganglionar en el 22% de los pacientes con CPNM mediante la presencia de anticuerpos dirigidos contra epitelio,

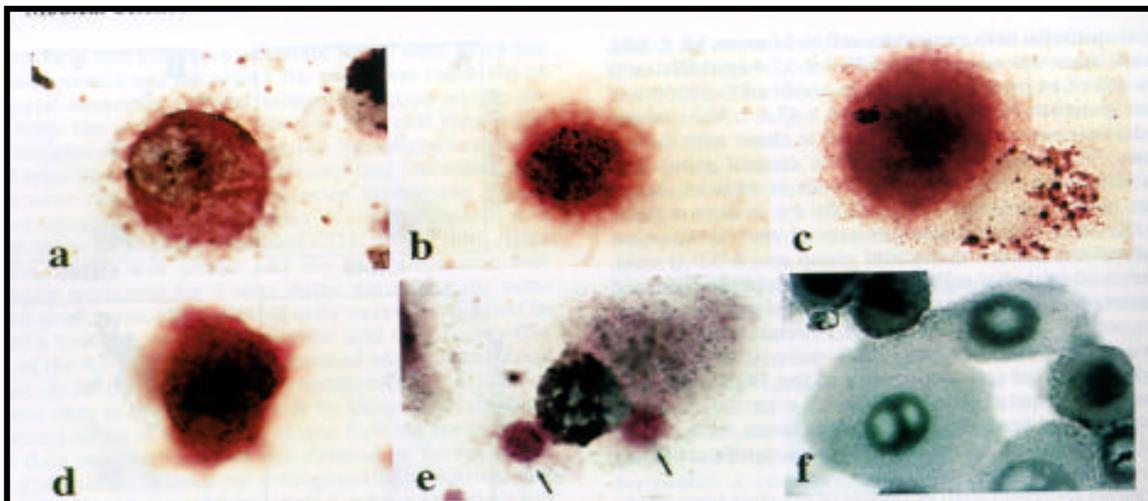
mientras que por las técnicas convencionales de histopatología, dichos ganglios estaban libres de afectación tumoral. Aún más, se asoció una peor supervivencia en aquellos pacientes que tenían la presencia de dichos anticuerpos.

Recientemente *Braun et al* han mostrado en pacientes intervenidas de cáncer de mama estadio I, II o III una correlación entre la presencia de células metastásicas en la médula ósea con un mayor riesgo de recaída, detectadas mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra citokeratina,. También se ha demostrado la presencia de micrometástasis en otras enfermedades como en el cáncer cervical donde *Van Trapeen et al* demostraron que hasta un 50% de las pacientes con estadio temprano, presentaban afectación ganglionar pélvica a través de la expresión de citokeratina 19.

Por tanto diversos estudios han demostrado a lo largo de estos últimos años, que el suero y el plasma de los pacientes son una fuente de abundante material genético fácilmente accesible.

**Figura 9.** Células circulantes de cáncer de mama, de próstata y células epiteliales normales, que expresan citokeratina y glicoproteína Muc-1. *Racila E et al*, PNAS 1998

- a- Célula teñida con anti-Muc-1 de una paciente con cáncer de mama metastásico,
- b- La misma paciente pero con tinción con anti-citokeratina 5, 6, 8 y 18,
- c- Célula teñida con anti-citokeratina de una paciente con cáncer de mama localizado,
- d- Célula teñida con anti-citokeratina de un paciente afecto de cáncer de próstata localizado,
- e- El mismo paciente que a- mostrando dos anticuerpos teñidos, probablemente células apoptóticas tumorales (flechas), teñidas con anti-citokeratina adheridas al macrófago,
- f- Epitelio normal teñido con anti-mucina-1



## 1.11 IMPLICACIÓN DEL GEN DE LA $\beta$ -TUBULINA EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

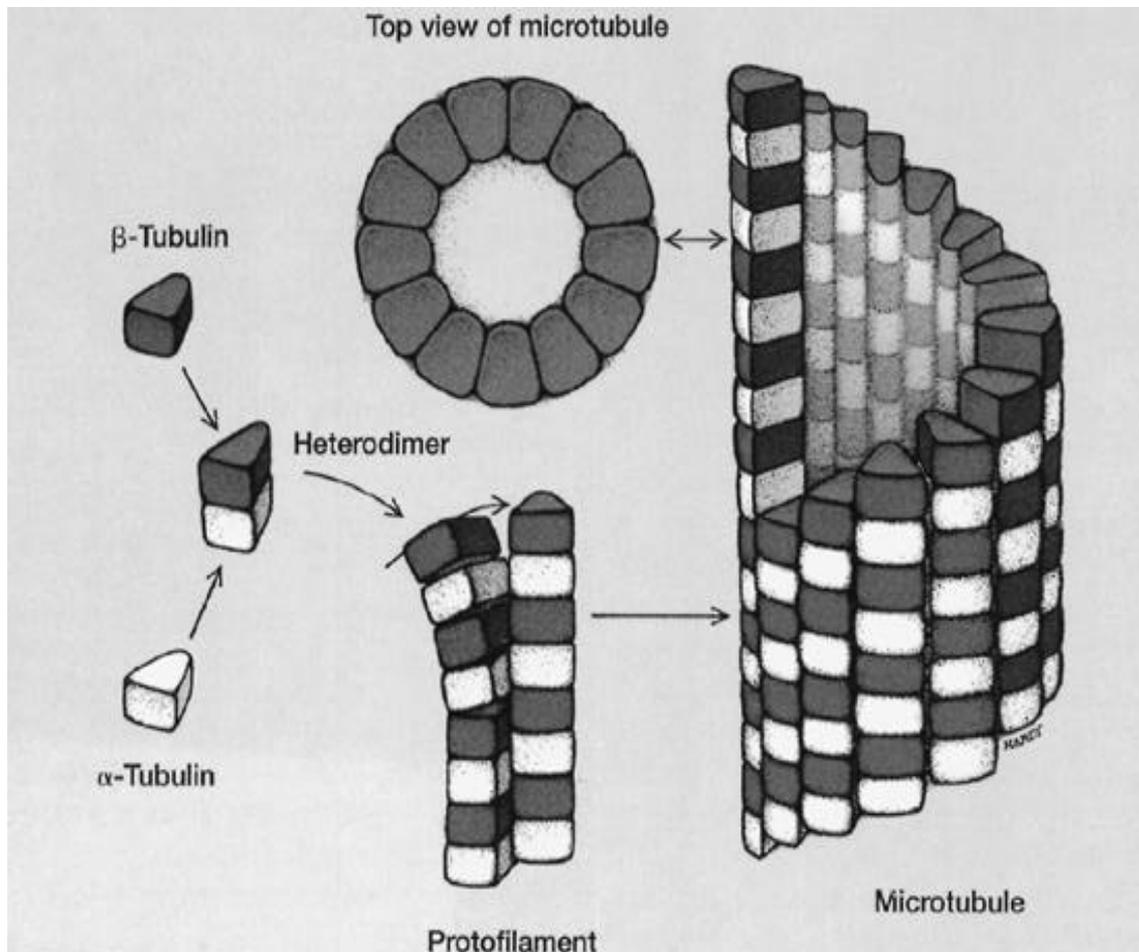
### 1.11.1. Generalidades del microtúbulo

Los microtúbulos se encuentran en el citoplasma de las células como filamentos individuales que irradian desde las proximidades del núcleo hacia la periferia. De este modo proporcionan un sistema de fibras a lo largo de las cuales pueden viajar los orgánulos. Los microtúbulos son unas estructuras proteicas filamentosas con una gran variedad de funciones, tanto de naturaleza dinámica como estática, vitales para la célula. Los microtúbulos participan en la división celular, la motilidad celular, la estructura celular y el transporte intracelular; y están constituidos por varios elementos: (1) protofilamentos de  $\alpha$ -tubulina, que forman el polo negativo cercano al centro de nucleación; (2) protofilamentos de  $\beta$ -tubulina, que forman el polo positivo, más distal y dinámico; (3) proteínas motoras (dineína citoplásmica, quinesina y dineína celular); y (4) proteínas estructurales (MAP 1A, MAP 1B, MAP 2A, MAP 2B, Tau...).

El microtúbulo es un cilindro hueco de 25 nm de diámetro externo y 14 nm de diámetro interno formado por trece protofilamentos (Figura 10). Estos son una hilera de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina alternantes. Cada protofilamento se une al siguiente desplazándose longitudinalmente 0,92 nm lo que genera una hélice levógira. Además, esta disposición de los protofilamentos hace que se genere una discontinuidad en los extremos de los microtúbulos.

En la célula los microtúbulos se polimerizan a partir de un centro organizador de microtúbulos (MTOC) localizado cerca del núcleo en el centro de la célula. Los extremos negativos de los microtúbulos se hallan fuertemente unidos a los MTOC, los cuales impiden el ensamblaje y desensamblaje de subunidades en este extremo. En las células animales este MTOC se llama centrosoma. Tiene dos centriolos situados en forma de L en el centro de un citosol amorfo (el material pericentriolar). Este material además contiene dos proteínas necesarias para el crecimiento y la formación de los microtúbulos:  $\gamma$ -tubulina y pericentrina.

**Figura 10.** Microtúbulos. De I. Ringel, IR Horwitz. *Paclitaxel affects microtubules dynamics and apoptosis. Adv Oncol 1999; 15: 1.*



Los microtúbulos no son estables pues se están constantemente polimerizando y despolimerizando lo que provoca el alargamiento y acortamiento de los mismos, básico para su correcto funcionamiento (representado en las figuras 11 y 12). La polimerización del microtúbulo se encuentra en un “equilibrio dinámico” con el *pool* o almacén intracelular de dímeros de tubulina. Este equilibrio se mantiene por una incorporación simultánea de dímeros libres en las estructuras polimerizadas y una liberación de los dímeros en el *pool* soluble de la tubulina. La dirección de este equilibrio - hacia la polimerización o despolimerización- está influida por varios cofactores, como son la concentración de GTP, el ambiente iónico, y las MAPs.

La polimerización incluye dos tipos de contactos entre las subunidades de tubulina: *interacciones longitudinales* o contacto de *cabeza-cola* que producen un crecimiento longitudinal de los protofilamentos, e *interacciones laterales* que completan la pared del microtúbulo. Parece que los contactos longitudinales son bastante más fuertes que los laterales. Para la polimerización se precisa además dos moléculas energéticas de GTP, una molécula se encuentra unida a la subunidad  $\alpha$  - en un extremo no intercambiable (*N-site* del inglés *non-exchangeable*), donde parece que tiene un papel meramente estructural, y otra segunda molécula de GTP unida a la subunidad  $\beta$  - en el extremo *E-site* (*exchangeable*). El crecimiento del microtúbulo ocurre espontáneamente en el extremo final produciendo la hidrólisis de la molécula de GTP a GDP con la consiguiente liberación de energía. El acortamiento del microtúbulo ocurre entonces en el extremo opuesto. Al estado de crecimiento se le denomina “estado de rescate” y al estado de despolimerización “estado de catástrofe”. Después del ensamblaje se llega a un “estado global constante” llamado también *inestabilidad dinámica*.

### **1.11.2. Estructura y función del gen de la tubulina**

La tubulina pertenece a una familia de proteínas globulares ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  tubulina) de gran homología entre sí. La tubulina es la subunidad básica del microtúbulo y como se ha mencionado anteriormente, está formado por dos polipéptidos,  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.

En la mayoría de los organismos la tubulina está codificada por una familia de genes estrechamente relacionados entre sí. En el caso del hombre son unos 15-20 miembros, muchos de los cuales son pseudogenes. Hay seis genes que codifican para la  $\alpha$ -tubulina y otros seis que codifican para la  $\beta$ -tubulina, que se expresan con diferentes patrones de desarrollo y expresión en los diferentes tejidos humanos (Tabla 12). La clona funcional de la  $\beta$ -tubulina es la M40 que se expresa en todos los tejidos del hombre. El gen de la  $\beta$ -tubulina se encuentra en la región 21.3 del cromosoma 6 (*6p21.3*) y contiene 4 exones. Como se comentará más adelante, es interesante ilustrar que el exón 4 codifica para el sitio de unión a GTP.

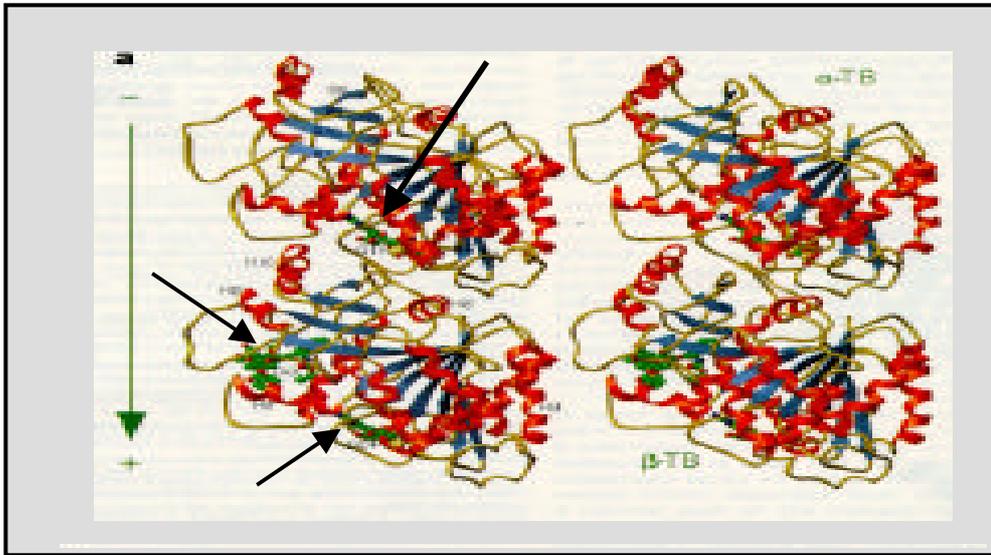
<b>Tabla 12.</b> Diferentes isotipos de la $\alpha$ -tubulina			
<i>Clase</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Expresión</i>	<i>Homología</i>
I	HM40	Constitutiva	95-98%
II	H 9	Preferentemente, en el cerebro, otros tejidos	
III	H 4	Cerebro	
IV a	H 5	Cerebro	
IV b	H 2	Constitutiva	
VI	H 1	Tejidos hematopoyéticos	75%

La presencia de estas isoformas ha motivado la especulación de que esta diversidad entre los microtúbulos (tipo neuronal, muscular...) puede deberse a una expresión diferencial de las mismas. La conservación de las secuencias de aminoácidos específicas de un isotipo entre especies, así como los patrones génicos de expresión (incluidos isotipos que sólo se encuentran en un determinado tejido) hacen pensar que cada isotipo tiene una función diferencial. Sin embargo, se ha demostrado que existe una gran versatilidad e intercambiabilidad entre los diferentes isotipos de  $\alpha$ -tubulina, lo cual resulta paradójico. Quizá estos isotipos presenten una regulación diferencial en cuanto a su expresión frente a diferentes factores de desarrollo. También puede que cada isotipo tienda a formar parte de una de las estructuras del citoesqueleto, potenciando dicha estructura las modificaciones postraduccionales.

Las proteínas  $\beta$  y  $\alpha$ -tubulina presentan una estructura globular de unos 4 nm de diámetro y un peso molecular de unos 50 kDa. Ambas presentan entre ellas un 40% de homología aminoacídica. Son proteínas ácidas y se encuentran libres en el citoplasma donde se hallan formando heterodímeros de  $\alpha$ -tubulina, de 8 nm de longitud. Cada una de ellas se caracterizan principalmente por:

1. -tubulina: incluye 451 aminoácidos. El extremo carboxilo terminal presenta muchos residuos ácidos (un 47%) y es el dominio de unión a las proteínas MAP y a los cationes (por ejemplo, el calcio). Cuatro aminoácidos de cisteína y dos de metionina que se encuentran entre los residuos 295-316 forman puentes de disulfuro, necesarios para la estabilización proteica. El sitio de unión al GTP se encuentra en un bolsillo proteico que presenta una región rica en glicinas (el sitio de unión del fosfato). La molécula de GTP unida a la -tubulina parece tener un papel estructural y no se intercambia (*N-site*).
2. -tubulina: contiene 445 aminoácidos. También presenta un extremo carboxilo terminal muy ácido al que se unen las proteínas MAP y un grupo de metioninas en la mitad carboxilo terminal de la molécula. Con frecuencia se fosforila un residuo de serina en la posición 413 o 420. El GTP se une al polipéptido en forma de complejo con el ión magnesio, mientras que la unión con el GDP es independiente del magnesio. En la -tubulina el sitio de unión al GTP presenta discrepancias respecto al dominio de unión de otras proteínas G. El sitio de unión al fosfato es demasiado grande, con un pliegue muy rico en residuos de glicina, que abarca los aminoácidos del 140 al 146 (Gly-Gly-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly). Además este pliegue se encuentra en el lado equivocado del que se piensa que se une la base (sobre el residuo 70). Esto confirma que la molécula de GTP es intercambiable en la subunidad (*E-site*). Además sugiere que la cadena gira alrededor del bolsillo de unión a guanina entre los residuos 12 y 70. Los sitios de unión a GTP son los siguientes: el fosfato a los aminoácidos 140-146, la ribosa del residuo 178 al 181 y la guanina del 60 al 77 o del 241 al 245.

Un estudio reciente efectuado por *Nogales et al* mediante cristalografía electrónica de la -tubulina extraída del cerebro bovino, ha divulgado que la estructura de la -tubulina contiene 2 láminas de 4 y 6 hojas plegadas, rodeadas por 12 hélices (Figura 13). La estructura tridimensional muestra que la superficie interna y externa son muy diferentes, y que existe una polaridad en ambos extremos.



**Figura 13.**

*Nogales et al, 1998. Nature*

Diagrama en cintas de la estructura de los dímeros de la tubulina. Las flechas negras indican en la subunidad  $\alpha$  (en lo alto de la figura) el GTP unido, y en la subunidad  $\beta$  - indica el GDP y paclitaxel (abajo). La flecha verde indica la dirección del protofilamento y el eje del microtúbulo.

La estructura del monómero es muy compacta, pero puede dividirse a su vez en tres dominios funcionales: dominio N- terminal, dominio intermedio y dominio C-terminal.

- a) Dominio N-terminal: Incluye los aminoácidos 1-205. Forma un pliegue llamado *pliegue de Rossmann*, que es típico de proteínas que unen nucleótidos. En este pliegue se alternan las hojas plegadas en paralelo con las hélices. El grupo fosfato del GTP se une en las zonas ricas en glicinas, cerca de los bucles o *loops* 1-H1 (aminoácidos 3-22), 2-H2 (aminoácidos 63-79), 3-H3 (aminoácidos 92-125) y 4-H4 (aminoácidos 133-160). La ribosa se une cerca del bucle 5-H5 (aminoácidos 165-192), la base del nucleótidos se une al aminoácido N206, en la hélice 6 (H6), y en los aminoácidos Y224 y N228 en la hélice 7 (H7). El paclitaxel se une entre los aminoácidos 1-31. El anillo del taxano se une en el aminoácido L275, al

principio del bucle 9-H9. Estas regiones de unión difieren un poco de las regiones presentadas hasta ahora en las tubulinas humanas, pero son una base para un estudio con profundidad de la tubulina humana.

- b) Dominio intermedio: Incluye los aminoácidos 206-381. Contiene una lámina mezclada y está envuelta por 5 hélices. Hay un bucle entre la hoja plegada -9 y la hoja plegada -10 que incluye el lugar que ocupa el paclitaxel.
- c) Dominio C-terminal: Incluye los aminoácidos restantes (382-445). Según la composición de esta región se producen las diferentes isoformas de la tubulina.

### 1.11.3. Paclitaxel: un agente antimicrotubulina

Los fármacos dirigidos contra la tubulina y contra los microtúbulos interfieren con la función del huso mitótico, y bloquean las células en la mitosis nuclear. También pueden alterar otras funciones de los microtúbulos como es la adhesión celular, la transmisión de señales, el transporte de sustancias... etc., etc. Estos fármacos se dividen en dos grupos: aquellos que desestabilizan los microtúbulos (alcaloides de la vinca, colchicina...) y aquellos que los estabilizan (taxanos, epotilonas,...).

El paclitaxel (Taxol®, Bristol Myers Squibb Company, Princeton, NY), extraído del árbol *Taxus brevifolia*, fue descrito por primera vez en 1971. En las células, el paclitaxel se une directamente a los microtúbulos en un punto de unión que es específico y diferente del sitio de unión del GTP y de otras drogas antitubulina como son la colchicina y la vinblastina. El paclitaxel favorece la polimerización del microtúbulo, promoviendo las fases de nucleación y elongación, y reduciendo la concentración del *pool* de tubulina soluble necesario para la polimerización. Pero aunque los microtúbulos formados en presencia de paclitaxel son muy estables, no son funcionantes. De hecho, el paclitaxel disminuye la presencia requerida de tubulina para el ensamblaje de microtúbulos en presencia o ausencia de factores que normalmente son esenciales como por ejemplo una temperatura de 37° C, un pH alcalino, la presencia de GTP exógeno o de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs). Los microtúbulos tratados con

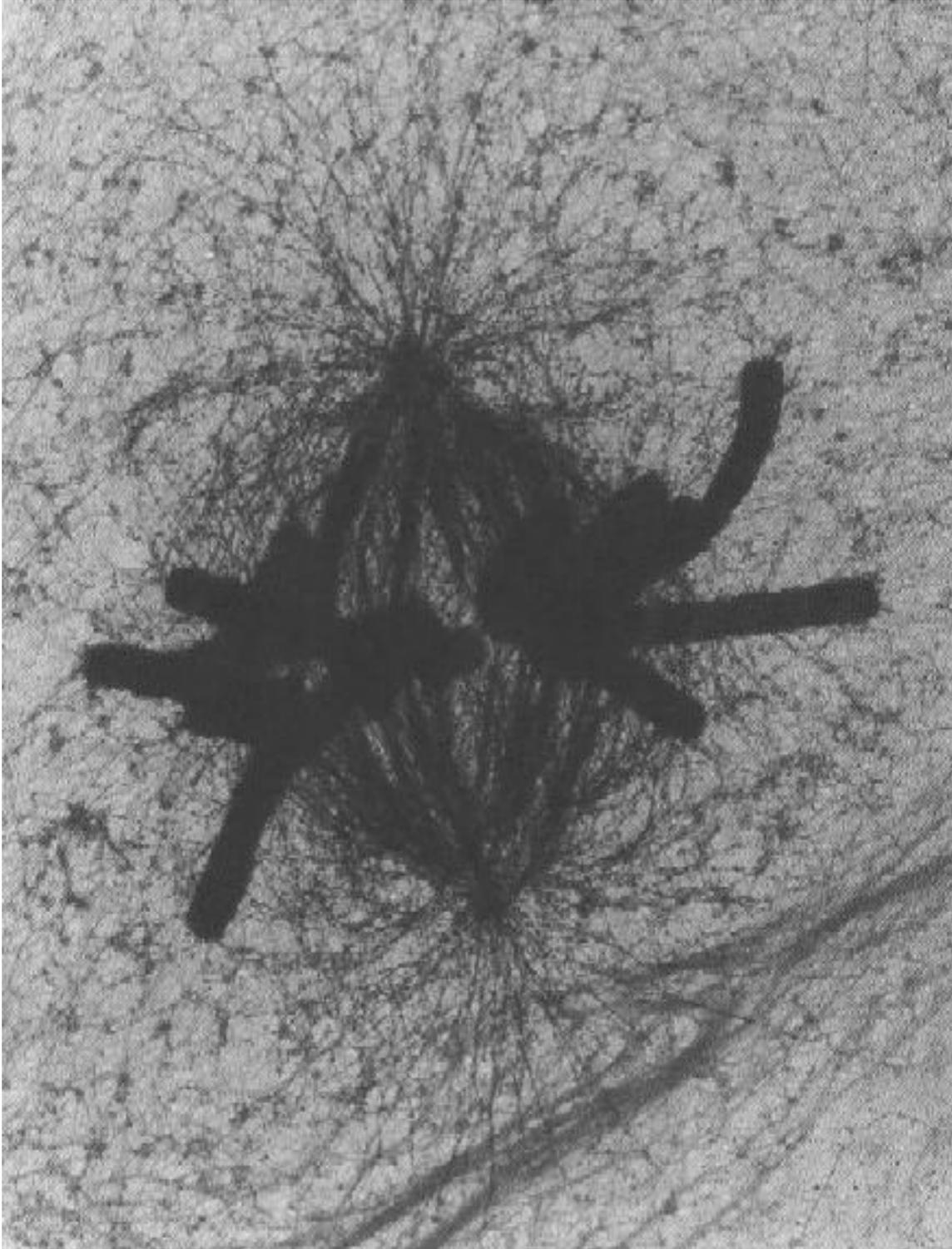
paclitaxel son estables incluso después de haberlos sometido a calcio o a bajas temperaturas, condiciones que normalmente producen una disociación de los mismos. Sin embargo esta estabilidad inusual producida por el paclitaxel provoca la inhibición del dinamismo de los microtúbulos y de su funcionamiento. La importancia del paclitaxel y de su interacción con los microtúbulos, radica en la gran actividad del paclitaxel en el CPNM, pues ha demostrado actividad incluso en pacientes previamente tratados. Investigadores de ECOG (*European Cooperative Oncology Group*) concluyeron que era el agente más activo evaluado en los últimos 10 años. En estudios fase II, los índices de actividad oscilaron entre el 21-24% de respuesta, con una supervivencia al año alrededor del 40%, incluso con alguna respuesta completa. Desde entonces, el paclitaxel se ha utilizado en combinación con otros fármacos citotóxicos, principalmente con cisplatino o carboplatino.

#### 1.11.4. Nuevos agentes antitubulina

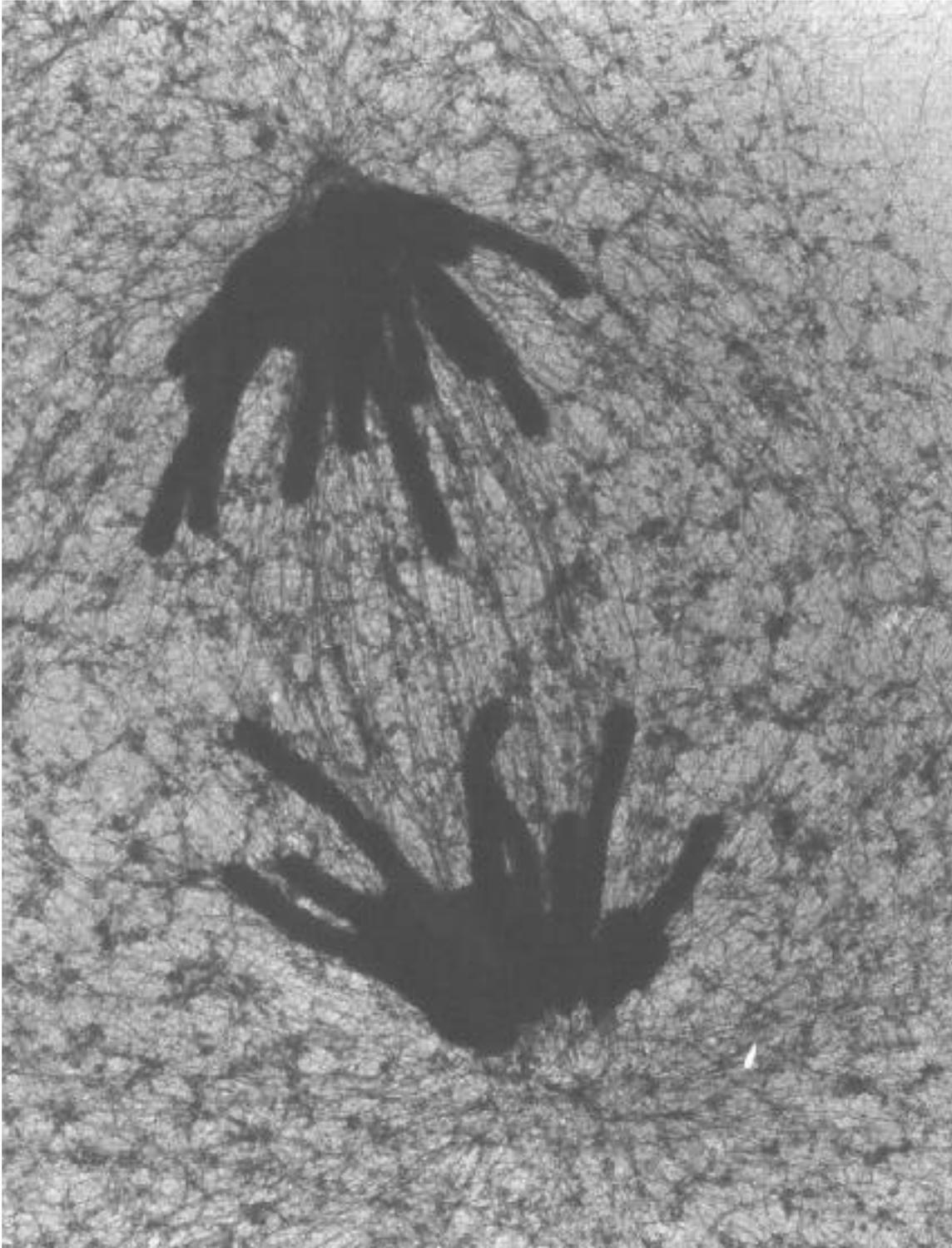
Debido a la importancia de la tubulina en el comportamiento celular, en los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de agentes dirigidos contra ella.

Tabla 13. Nuevos agentes antitubulina

<i>Agente</i>	<i>Origen</i>	<i>Compite con</i>	<i>Rango de actividad</i>	<i>Sensibilidad a MDR</i>	<i>Comentarios</i>
Dicodermolida	Esponja	Taxanos	< nM	Baja	Posible inmunosupresor, más potente que el paclitaxel
Epotilonas A y B	Micobacteria	Taxanos	nM	Baja	Equipotente al paclitaxel
Dolastatin	Molusco	Vincas	μM	Alta	Péptido
Criptoficina	Cianobacteria	Vincas	pM	Baja	Péptido
Curacina A	Cianobacteria	Colcichina	nM	Desconocida	



**Figura 11.** Célula de mamífero en metafase. La posición de los polos, de los cromosomas y de los microtúbulos es característica para la formación del huso mitótico. JR Mc Intosh. *The roles of microtubules in Chromosome movement. Microtubules*, 1994; 414.



**Figura 12.** Separación de los cromosomas en la fase de la mitosis. Los microtúbulos se polimerizan y provocan este movimiento de distanciamiento. *Microtubules*, 1994; 429.

## 1.12. QUIMIORESISTENCIA EN EL CÁNCER DE PULMÓN

### 1.12.1. Mecanismos de quimioresistencia

Con frecuencia observamos en nuestros pacientes la aparición de resistencia a la quimioterapia, bien desde el inicio del tratamiento quimioterápico, bien durante el momento de la progresión tumoral. Cuando el paciente no experimenta más allá de una respuesta parcial al tratamiento, consideramos que el tumor es *resistente* al agente utilizado. En la práctica clínica es el mayor obstáculo para el control del cáncer, y es difícil saber si esta resistencia es adquirida o innata al propio tumor. También observamos repetidamente en el ejercicio diario, que pacientes afectos de tumores similares, responden de manera muy desigual a un mismo tratamiento, tanto en respuesta como en toxicidad. Un avance muy importante en la clínica sería poder predecir qué tipo de paciente responderá a un tratamiento quimioterápico en concreto y qué tipo de paciente no lo hará, incluso prever una posible toxicidad al tratamiento.

Los cambios que suceden a nivel celular en un tumor, no sólo están implicados en el desarrollo y diseminación del mismo, sino también en su potencial resistencia a agentes quimioterápicos. Esta falta de sensibilidad a la quimioterapia, puede producirse en líneas generales por cuatro mecanismos principales: (1) mecanismos de desintoxicación celular; (2) mecanismos de reparación de ADN; (3) alteraciones de la expresión de las enzimas diana del fármaco; y (4) mecanismos de inhibición de la apoptosis.

Los avances en el campo de la biología molecular durante estos últimos años relacionan la presencia de ciertos genes con resistencia a ciertos fármacos. Estos son algunos de los genes relacionados:

- Resistencia al platino y el gen *ERCC-1* (*excision repair cross-complementing*); parece que la citotoxicidad del platino está provocada a través de una desorganización del ADN celular y del gen *ERCC-1* que es un gen crítico en la reparación celular. Estudios experimentales han demostrado que agentes que inhiben la expresión del *ERCC-1* tienen actividad sinérgica con el cisplatino. Recientemente

se ha relacionado los niveles de mRNA del gen *ERCC-1* con la respuesta y supervivencia en pacientes afectos de cáncer gástrico tratados con cisplatino (Metzger, 1998).

- Resistencia al 5-fluorouracilo y el gen *E2F-1*. Se trata de un factor de transcripción esencial para la progresión de la fase G1 a la fase S de la mitosis. Las células que sobreexpresan *e2F-1* presentan niveles elevados de TS (timilatosintasa) y son resistentes a fármacos como 5-fluorouracilo.
- Resistencia a taxanos y el gen *NF-κB*. El gen *NF-κB* regula otros genes favorecedores de la diseminación metastásica, de la angiogénesis, de la resistencia a múltiples drogas y de la antiapoptosis. Normalmente se encuentra en el citoplasma en un estado inactivo. Cuando se activa se traslada al núcleo y activa a su vez genes que protegen a las células de la apoptosis producida por el paclitaxel.
- Resistencia a la gemcitabina y *LOH en el cromosoma 11p15.5*; el centrómero del cromosoma 11 presenta en muchos tumores una pérdida de alelos. Esta región denominada *LOH 11A* está ausente en el 75% de los tumores de pulmón, y se ha relacionado con un mayor estadio (TNM) y diseminación metastásica (Bepler, 1998). Esto se explica por la presencia del gen *RRM1* que codifica la enzima *RR* (ribonucleótido reductasa) que interviene en el metabolismo de la gemcitabina.
- Resistencia a los taxanos y el gen *p53*. La *p53* proteína multifuncional relacionada con el control del ciclo celular, la reparación de ADN, la recombinación de ADN, el inicio de apoptosis y control de la diferenciación celular, podría tener un papel en la resistencia a los taxanos, aunque su utilidad clínica es incierta.
- Otros:
  - *RASSF1* y citotoxicidad al cisplatino,
  - *K-ras* y mayor sensibilidad a la gemcitabina.

### 1.12.2. Mecanismos de resistencia mediados por el gen de la tubulina

El papel fundamental de la tubulina en la división celular provoca un gran interés en estudiar los agentes dirigidos contra ella. Varios mecanismos específicos podrían estar implicados en la resistencia a estos fármacos:

1. Fenotipo MDR-1 ( del inglés *multidrug resistance*) o gen de resistencia a múltiples drogas. Este gen codifica la proteína de membrana *glicoproteína P*, que actúa como una proteína transportadora, y que mediante un mecanismo activo de bomba celular-dependiente de ATP- mantiene la concentración intracelular de diferentes drogas citostáticas a un bajo nivel. La amplificación o sobreexpresión de MDR aumentaría la concentración de la glicoproteína P. La expresión de esta glicoproteína *in vitro* está asociada con la resistencia a diferentes drogas, entre ellas el paclitaxel. Sin embargo, hay autores que opinan que los pacientes con este fenotipo no presentan una mayor resistencia a este fármaco.
2. Aumento de los niveles celulares de -tubulina, por mecanismos aún no esclarecidos.
3. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x inhibe la apoptosis inducida por paclitaxel, sin afectar a su acción sobre los microtúbulos o el ciclo celular.
4. Alteración de la expresión de los isotipos de -tubulina. Aunque está descrito que podría afectar a la sensibilidad a los taxanos, la importancia funcional de los diferentes isotipos de -tubulina es incierta. *Kallavaris et al* mostraron que la mayor expresión del isotipo III podría corresponderse con una mayor resistencia al paclitaxel.
5. Mutaciones adquiridas o intrínsecas de la -tubulina. De acuerdo con el modelo atómico de / tubulina, las mutaciones en los residuos 270, 274, y 282 confieren resistencia a los taxanos. *González-Garay et al* identificaron mutaciones puntuales de la -tubulina en 9 líneas celulares CHO resistentes a paclitaxel, y *Giannakakou et al* identificaron también mutaciones de la -tubulina en células humanas de cáncer de ovario resistentes al paclitaxel. Encontraron dos mutaciones somáticas en los aminoácidos 270 y 360 de la -tubulina de la clase I, que es la mayoritaria. Por tanto, las mutaciones de la -tubulina pueden representar un proceso indicativo de resistencia farmacológica intrínseca.

### **1.13. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO**

El carcinoma de pulmón constituye un gran problema de salud pública en nuestro medio, con una gran incidencia y acompañado de una alta morbi-mortalidad.

Hoy por hoy, la mayoría de los pacientes afectos de cáncer de pulmón se presentan con un estadio avanzado, y tan sólo un pequeño porcentaje tiene una neoplasia localizada susceptible de tratamiento curativo. Sin embargo, incluso en aquellos casos con estadios localizados, un gran porcentaje de los mismos recidivan a nivel local o a distancia, y la mayoría mueren por progresión de la enfermedad. Es evidente que los factores pronósticos clínicos e histológicos clásicos de los que disponemos, así como la respuesta radiológica al tratamiento, son insuficientes para predecir la evolución de cada enfermo en particular. Por tanto, es importante la identificación de nuevas características biológicas y moleculares de la neoplasia determinantes de la agresividad y evolución del tumor. La aplicación de estos marcadores en la práctica clínica nos ayudaría a individualizar el tratamiento idóneo y mejorar el pronóstico de cada paciente en concreto.

El tratamiento del cáncer de pulmón ha experimentado una progresión durante los últimos años, la quimioterapia se ha establecido como un arma terapéutica fundamental pero, por sí misma y en conjunto con la radioterapia, continúa siendo muy tóxica. El mayor obstáculo de la quimioterapia, es el desarrollo de resistencia a la misma, y la presencia de efectos secundarios tóxicos para el paciente, que en ocasiones impiden su administración. Por ello, la determinación de la sensibilidad y toxicidad individual de cada paciente a un determinado fármaco evitaría toxicidades innecesarias y permitiría una mejor selección de tratamiento.

Así pues, el cáncer de pulmón supone un reto de gran magnitud al que se enfrenta el oncólogo médico. Por este motivo está justificado el análisis y estudio de un posible marcador molecular, accesible en la práctica oncológica y con posibilidades de aplicación en la mayoría de los hospitales, que nos ayude a determinar el pronóstico y el tratamiento más adecuado del paciente afecto de cáncer de pulmón.

## **2. OBJETIVOS**

Es un hecho que en el momento actual, los resultados del tratamiento del cáncer de pulmón han mejorado, y que la introducción de nuevos agentes terapéuticos ha conducido a un mayor número de respuestas y estabilizaciones cuando los pacientes son tratados con quimioterapia. Los ensayos y estudios clínicos utilizan combinaciones con dobles, tripletes y con quimioterapias secuenciales con el fin de mejorar estos resultados. Pero los últimos estudios realizados muestran que ninguna de estas combinaciones es superior a otra. Igualmente el empleo de terapias combinadas con quimioradioterapia y cirugía han conseguido mejorar los índices de respuestas pero la supervivencia global no ha experimentado grandes cambios, y es evidente que es necesario que los resultados mejoren. El desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas intenta mejorar la estadificación y con ello perfilar el pronóstico de una manera más precisa en cada paciente. Sin embargo, es gracias al análisis del ADN y ARN del suero del paciente, que podemos determinar y estudiar el material genético y aquellos genes que son diana específica para determinados agentes citotóxicos y otros que pueden ser marcadores de resistencia a ciertas drogas. Con esta información, podríamos crear una guía individualizada de tratamiento para cada paciente.

Este estudio realizado se enmarca en la línea de trabajo desarrollada en los últimos años por el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, de búsqueda de factores moleculares, pronósticos y predictivos en las neoplasias de mayor relevancia en nuestro medio (pulmón, colon y mama), con el objetivo de seleccionar pacientes con tumores de curso más agresivo que sean susceptibles de un tratamiento más específico e individualizado.

El cáncer de pulmón es un claro ejemplo de que la respuesta clínico-radiológica e histológica no es suficiente para determinar la eficacia de un tratamiento (quirúrgico o no) y que las alteraciones genéticas detectadas pueden utilizarse como biomarcadores que potencien una fiabilidad en la valoración de respuesta y un pronóstico. Asimismo el análisis de dichas alteraciones genéticas debería ser fácilmente accesible y de manejo práctico para el oncólogo médico habitual.

Todo ello ha motivado el desarrollo de esta tesis doctoral, cuyos objetivos planteados al inicio de la misma son:

1. Estudio de la presencia de ADN tumoral en la sangre.
  - 1.1. Estudio de la cuantificación del ADN sérico en pacientes intervenidos de un cáncer de pulmón de célula no pequeña
  - 1.2. Estudio de la cuantificación del ADN sérico en sujetos sanos
  - 1.3. Estudio de la repercusión de la detección de ADN tumoral en sangre
  
2. Estudio de la prevalencia de mutaciones del gen de la  $\beta$ -tubulina en el ADN sérico y en tejido tumoral en el cáncer de pulmón de célula no pequeña intervenido.
  - 2.1. Estudio de la presencia de mutaciones de la  $\beta$ -tubulina en el ADN sérico de los pacientes intervenidos de un cáncer de pulmón de célula no pequeña
  - 2.2. Estudio de la presencia de mutaciones de la  $\beta$ -tubulina en el tejido tumoral de los pacientes intervenidos de un cáncer de pulmón de célula no pequeña
  - 2.3. Estudio de la correlación entre las mutaciones y las características clínicas de los pacientes
  
3. Determinación de la importancia de las mutaciones del gen de la  $\beta$ -tubulina detectadas en el ADN sérico como factor pronóstico.