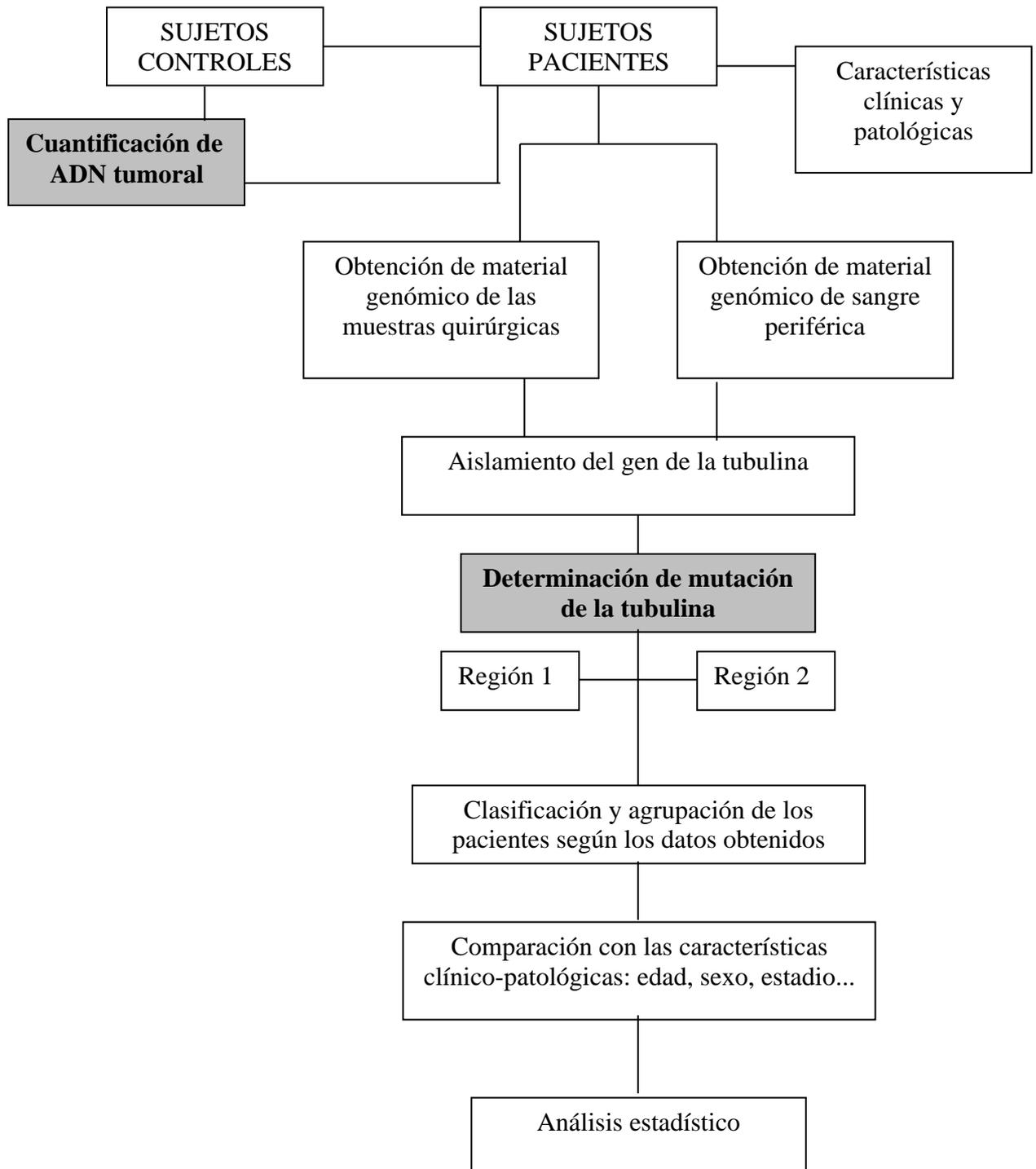


3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. ORGANIGRAMA DE TRABAJO



3.2. PACIENTES

Se trata de un estudio donde la muestra objeto son los pacientes intervenidos de un carcinoma de pulmón no microcítico en el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona) entre 1992 y 1996. Se disponía información clínica del momento del diagnóstico, tratamiento y seguimiento de 52 pacientes, y material de tejido tumoral de 19 casos. La mediana de seguimiento del estudio es de 18.9 meses (con un recorrido entre 1 y 130 meses).

Todos los pacientes habían sido intervenidos de un cáncer de pulmón de célula no pequeña estadio I-IIIa. El estudio preoperatorio comprendió una anamnesis completa, exploración física y una tomografía computerizada (TC) de tórax y de hemiabdomen superior para descartar afectación tumoral a distancia. La estadificación se estableció según la clasificación TNM de 1997 modificada por *Mountain* (T, tumor primario; N, ganglios nodales; M, metástasis), basándose en el estudio anatómico-patológico de la pieza quirúrgica. Los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica no radical por afectación de los márgenes de resección o afectación tumoral de los ganglios mediastínicos del nivel superior, recibieron quimioterapia o radioterapia adyuvante en algunos casos. El seguimiento de estos pacientes comprendió visitas periódicas cada 3 meses durante los dos primeros años, cada 6 meses entre el tercer y quinto año y anualmente en los siguientes años. Si durante el seguimiento se sospechaba una recidiva tumoral, se procedía de nuevo a un estudio de re-estadificación del paciente. Aquellos que presentaron recidiva tumoral se trataron con quimioterapia sistémica endovenosa.

El suero extraído de los pacientes se comparó con el de 112 donantes de sangre sanos utilizados como método de control, a los que previamente se solicitó su consentimiento. Varios de estos controles se utilizaron para la identificación de polimorfismos y para excluir la posibilidad de mutaciones incorrectas. Se secuenciaron 30 muestras de ADN que procedían de tres fuentes: 10 muestras de ADN genómico de linfocitos, 10 muestras de tejido pulmonar normal de los pacientes incluidos en esta serie, y 10 muestras de suero de sujetos sanos control.

3.3. VARIABLES A ESTUDIO

Las *variables clínicas* evaluadas para cada paciente fueron:

- Edad y sexo.
- Hábito tabáquico
- Estado basal del paciente (*Performance Status*, según la clasificación de la OMS)
- Tipo de intervención quirúrgica practicada
- Estadio de la enfermedad clínico-quirúrgico según la clasificación TNM revisada por *Montain* en 1997
- Empleo de quimioterapia y su indicación (neoadyuvante, adyuvante)
- Empleo de radioterapia adyuvante
- Existencia de recidiva y/o progresión y el tiempo transcurrido desde la intervención
- Supervivencia, desde el momento del primer tratamiento hasta la muerte del paciente por cualquier causa o fin del estudio, o pérdida de seguimiento del paciente por otras causas.

De cada *pieza quirúrgica* se determinó por parte del servicio de Anatomía Patológica:

- Tipo histológico
- Grado de diferenciación histológica

En el *Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol* se determinó:

- Niveles séricos de ADN genómico en los pacientes intervenidos
- Niveles séricos de ADN genómico en los 112 individuos sanos
- Presencia de mutación del gen de la β -tubulina en el ADN sanguíneo de los 52 pacientes a estudio
- Presencia de mutación del gen de la β -tubulina en el ADN sanguíneo de las 30 muestras sanas utilizadas como control
- Presencia de mutación del gen de la β -tubulina en tejido fresco de las 19 muestras quirúrgicas que se disponían
- Tipo y localización de la mutación

3.4. MÉTODOS

El estudio de biología molecular se llevó a término en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Las extracciones sanguíneas se realizaron en el Hospital de Día de Quimioterapia por el servicio de Enfermería y las muestras tumorales quirúrgicas fueron proporcionadas por el servicio de Cirugía Torácica.

A la hora de analizar las muestras materiales obtenidas hay que tener presente que todas ellas presentan una gran diversidad poblacional celular. Las muestras del acto quirúrgico (*in vivo*) se diferencian de las muestras obtenidas *in vitro* (de una mayor homología celular) debido a que presentan subpoblaciones celulares con una gran

variabilidad genética, y con presencia de mutaciones en proporciones desconocidas. Esta falta de consistencia entre las muestras es aún mayor en el ADN obtenido del suero, donde ADN normal y tumoral se mezclan. Todo ello añade una dificultad *extra* en la obtención del material genético.

Para obtener la secuencia de nucleótidos de un gen o de una hebra de ADN es necesario utilizar una técnica o método que nos permita conocer exactamente la secuencia de ADN que estamos buscando. Para estudiar la secuencia de una muestra de ADN genómico, hoy en día se utilizan dos métodos principalmente: introducción del gen en un vector o secuenciación directa de los productos de la PCR. Actualmente, la técnica de secuenciación automática nos permite obtener secuencias de ADN fiables y reproducibles. En este estudio se utilizó esta última técnica.

Para el análisis de las muestras, se siguió la metodología que a continuación se describe:

3.4.1. Obtención del material genético

Hay varios protocolos que permiten extraer el ADN a partir de diferentes orígenes, como tejido fresco o congelado, sangre, suero y de material parafinado de laminillas histológicas. En nuestro estudio se extrajo el ADN de tejido fresco (tumoral y sano) y de suero:

- 1.1. ADN del tejido fresco: Se obtuvo ADN de tejido tumoral de 19 pacientes y de tejido pulmonar sano de 10 pacientes sometidos a cirugía. El tejido se congeló inmediatamente tras la intervención quirúrgica en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su posterior uso en el laboratorio. Aproximadamente 10 μg de tejido se utilizaron para el aislamiento del ADN, que se realizó de acuerdo con el procedimiento estándar según la casa comercial Qiagen de Alemania (*kit* de DNeasy Tissue).
- 1.2. ADN del suero: Se extrajeron 10 ml de sangre de los pacientes y de los sujetos sanos controles, y en un tubo de cristal con un gel y una sustancia activadora de

la coagulación, se mantuvieron durante 2 horas. Después se centrifugaron a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y se mantuvieron a 4° C. Se utilizaron para la extracción de ADN 200 µl de suero, que se realizó según el procedimiento estándar de la casa comercial Qiagen de Alemania (QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250)).

3.4.2. Cuantificación del ADN genómico

Una vez extraído el ADN, este puede visualizarse en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El *bromuro de etidio* presenta dos características importantes. Primero, se intercala entre los ácidos nucleicos del ADN y emite fluorescencia si se ilumina con luz ultravioleta, y el ADN así teñido se observa como una banda de más o menos intensidad. Y segundo, la introducción en el gel de un marcador de peso molecular conocido, nos sirve como punto de referencia de la calidad del ADN extraído; de forma que cuanto más alta y nítida es la banda de ADN, de más calidad es el mismo, mientras que bandas de ADN situadas en la franja baja del gel, son sinónimas de ADN apoptótico o degradado.

La cuantificación del ADN se efectúa sometiendo el ADN a la luz ultravioleta y concretamente a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm) que es la que absorben los ácidos nucleicos, mientras que las proteínas absorben a 280 nm. Se mide mediante un *espectrofotómetro* (Figura 14) y la lectura espectrofotométrica nos indica la concentración de ADN en µg/mL, además de la relación (o ratio) de las absorbencias A260/A280. Un valor de ratio de 1.9 nos indica una máxima pureza del ADN, mientras que ratios inferiores son indicativas de la presencia de elementos contaminantes en la muestra de ADN, tal como las proteínas. Cuanto más puro es el ADN mayor rendimiento obtendremos al efectuar la PCR.

3.4.3. Amplificación del gen de la tubulina

La PCR es una técnica basada en la complementariedad de las bases del ADN, que permite la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos a partir de muy pocas cantidades de ADN. Para llevar a cabo dicha técnica se necesitan los componentes básicos que intervienen en la replicación del ADN dentro de las células. Estos componentes son: un ADN molde, unos iniciadores, unas unidades monoméricas o nucleótidos y una enzima polimerasa capaz de llevar a cabo la reacción.

1. ADN molde o *template*: se refiere al ADN extraído, purificado y listo para ser amplificado.
2. Cebadores, iniciadores o *primers*: para la amplificación de una secuencia específica de un gen se requiere un par de cebadores o *primers* que van a delimitar la secuencia que debe ser ampliada. Uno de ellos se une a la cadena molde definida como directa en sentido 5' 3', que es la que presenta la secuencia nucleotídica de referencia. El otro cebador se une a la otra cadena conocida como *reverse* o antisentido 3' 5'. La longitud de los cebadores varía entre 20 y 30 nucleótidos.

Para evitar la amplificación de genes inespecíficos o de pseudogenes, el diseño del *primer* es crítico en el desarrollo de la PCR. Los *primers* de este estudio reúnen las siguientes condiciones:

- a) *Amplifican específicamente el clon M40 de la β -tubulina*
- b) *Evitan la amplificación de pseudogenes de la β -tubulina*

a- Amplifican específicamente el clon M40 de la β -tubulina

El *primer* o cebador *forward* (sentido) y el *primer reverse* (antisentido) se registraron en la base de datos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) obteniendo en ambos una alineación muy homónima con el clon M40 del gen humano de la β -tubulina (Tabla 14).

b- Evitan la amplificación de pseudogenes de la β -tubulina

Los pseudogenes se caracterizan típicamente por la ausencia tanto del promotor 5' como de la presencia de intrones (regiones no informativas), y porque además no codifican proteínas.

En el protocolo de amplificación de PCR y secuenciación del gen de la β -tubulina, para evitar la presencia de pseudogenes,

- los *primers* para la PCR se designaron a partir de intrones
- los productos de la PCR, tras la secuenciación se compararon con las secuencias de los pseudogenes de la β -tubulina, para descartar dichas frecuencias (Tabla 15)

3. Nucleótidos trifosfato: son las unidades monoméricas utilizadas para la síntesis de nuevas cadenas complementarias de ADN.
4. ADN Polimerasa (*Taq Polimerasa*): esta enzima sintetizada a partir de bacterias de aguas termales (*Thermus aquaticus*) es altamente termoestable, al contrario que las polimerasas existentes en los organismos eucariotas, lo que permite que a temperaturas de 72-74° C sea capaz de incorporar entre 40 y 100 nucleótidos por segundo a la nueva cadena de ADN que se está sintetizando. La cantidad de enzima que se añade a la reacción de amplificación se mide en unidades por microlitro. Una unidad (U) es la cantidad de *Taq* polimerasa necesaria para incorporar 100 ng de nucleótidos en un tiempo de 1 minuto a una temperatura de 72° C.
5. Cloruro de magnesio: los iones de magnesio son necesarios para la función de la enzima polimerasa. El magnesio es indispensable para aumentar el rendimiento de este tipo de reacción, pero hay que tener en cuenta que un exceso también puede provocar la unión inespecífica de los cebadores en regiones del genoma que no nos interesa amplificar.

6. Tampón o *buffer* para la PCR: la reacción de amplificación mediante el uso de polimerasas termoestables requiere de un medio en unas condiciones tamponadas muy específicas. Son una mezcla de sales y otros elementos que proporcionan este medio óptimo. Los componentes más habituales de estas soluciones son: Tris-HCL con un pH entre 8.5-9.0, EDTA, KCl, MgCl₂, Triton-X (detergente no iónico) al 0.01%.

Figura 14. Espectrofotómetro utilizado en el Laboratorio. *Scan 2000*, de *Pharmacia Biotech*.



Tabla 14. Cebadores o *primers* del gen de la tubulina

<i>Exón</i>	<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T_m</i>	<i>Pares de bases</i>
1	Forward	TGCCCCACAACCATTTTTT	57°C	180
	Reverse	TGCCCCATACATACCTTGA		
2 y 3	Forward	GGGCCATAGTTGGCTGGGACT	68°C	615
	Reverse	CCTGTGTCCTTGCCCCAAATAAG		
4	Forward	AAGGAGATACATCCGAGGGAATTAT	59.4°C	1216
	Reverse	GGCAGTTGAGTAAGACGGCTAA		

T_m= *melting temperature* o temperatura de fusión

Tabla 15. Pseudogenes de la α -tubulina			
<i>Pseudogen</i>	<i>Nº de acceso</i>	<i>Codón /secuencia del pseudogen</i>	<i>Codón /secuencia del clon M40</i>
Clon 46-	J00317	140-GGT 142-CGC 220-CCC 222-TAT 241-CGC	140-GGC 142-GGC 220-CCA 222-TAC 241-CGT
Clon 14-	K00840	201-TGT 140-GGT perdido	201-TGC 140-GGC
Clon TUB4Q	U83668	120/GTC 121/AGA 124/GCT 132/GGT 138/TCC 140/GGT	120/GTA 121/CGG 124/GCA 132/GGC 138/TCA 140/GGC
<i>Pseudogen</i>	<i>Nº de acceso</i>	<i>Secuencia específica del pseudogen</i>	<i>Secuencia específica del clon M40</i>
Clon 46-	J00317	Del codón 225 AAC AAC CTC CTC GTG TAA GAC ACC	Del codón 225 CTG AAC CAC CTT GTC TCA GGC ACC
Clon 14-	K00840	Del codón 140 ACT GGG ACA CAG Del Codón 240 C TCC ACT TCC TGG CCA GCT CAG TGC	Del codón 140 GGC GGG GGC ACA GGC
Clon TUB4Q	U83668	Del codón 140 GGT GGG GGG ACT GGG TCT GGG ATG	Del codón 140 GGC GGG GGC ACA GGC TCT GGA ATG
Clon 11	J00316	Del codón 140 GGC GCA CAA GCT CGG GTA TGG GCA	Del codón 140 GGC GGG GGC ACA GGC TCT GGA ATG
Clon nuk 278	X83668	Del codón 140 GGT GGG GGG ACT GGG TCT GGG ATG	Del codón 140 GGC GGG GGC ACA GGC TCT GGA ATG
Clon 5-	X00734	Del codón 140 GGG GTT GGG ACG GGG TCC GGA	GGC GGG GGC ACA GGC TCT GGA
Clon 7-	K00842	Del codón 140 ACT CTC TTT ATC AGC AAG ATC CGA	Del codón 140 GGC GGG GGCACA GGC TCT GGA ATG
Las letras en negrita indican la diferencia de base entre el clon funcional M40 y el pseudogen de la tubulina.			

En el Laboratorio de Biología Molecular, cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ L del llamado *master mix* (Tabla 16).

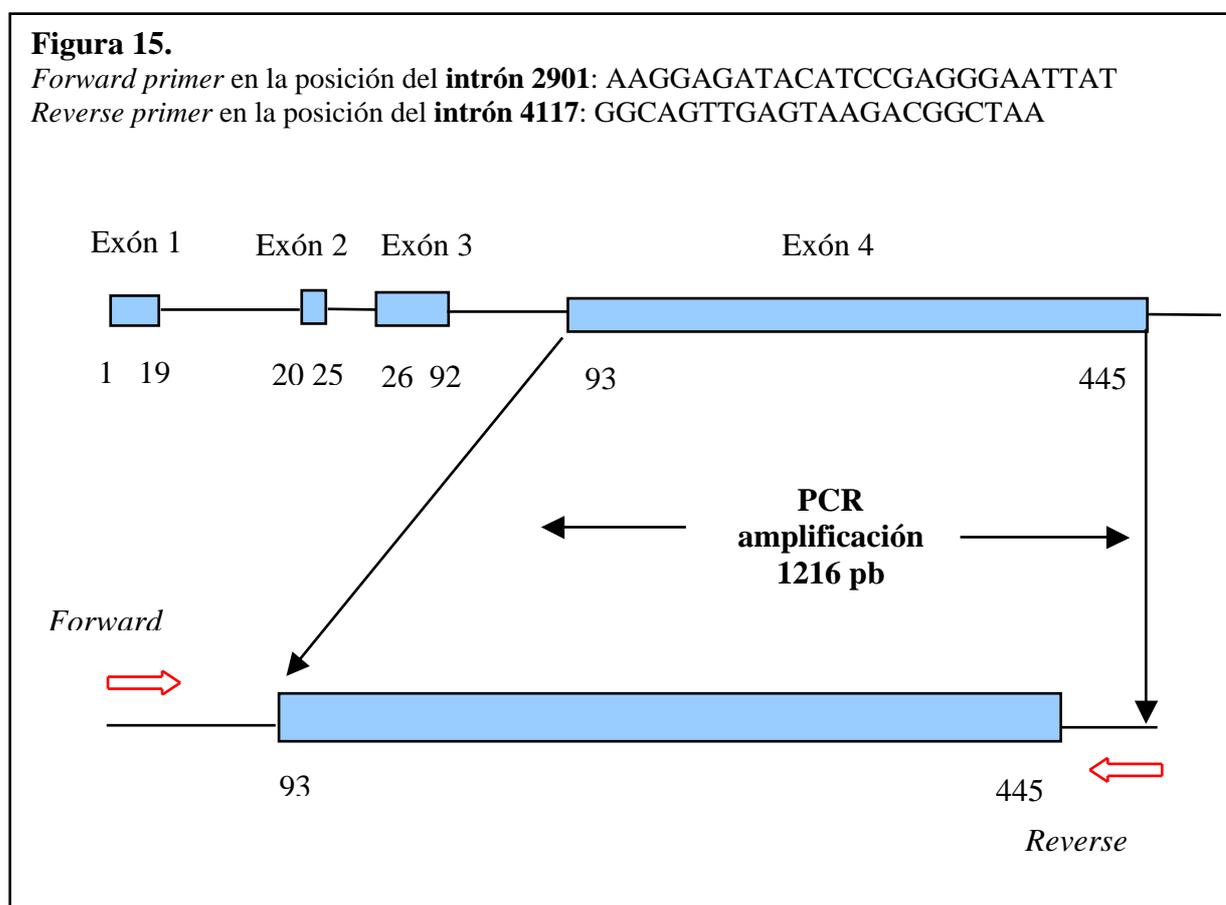
Tabla 16. Componentes de la master mix

ADN sérico	3 μ L	
Tampón	5 μ L	95° C - 10'
MgCl ₂ (50 mM)	2 μ L	94° C - 30'' x 35
dNTPs (10 mM cada uno)	0.6 μ L	60° C - 45''
Primer 1 (10 uM)	0.7 μ L	72° C - 90''
Primer 2 (10u M)	0.7 μ L	74° C - 7'
Taq Polimerasa(5u/ μ L)	0.5 μ L	

Utilizando el protocolo descrito de PCR se procedió a la amplificación de los 4 exones de la α -tubulina en tres PCR realizadas por separado. Los exones 1 y 4 se amplificaron por separado, y los exones 2 y 3 de manera conjunta (Figura 15).

Figura 15.

Forward primer en la posición del **intrón 2901**: AAGGAGATACATCCGAGGGAATTAT
Reverse primer en la posición del **intrón 4117**: GGCAGTTGAGTAAGACGGCTAA



Para obtener un número muy elevado de copias del fragmento de ADN que nos interesa estudiar, es necesario un proceso que requiere repetir en un número determinado de ocasiones un programa de temperatura o ciclos en unos aparatos llamados *termocicladores* (GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer, USA), cuya característica principal es la oscilación de temperaturas en un período muy corto de tiempo.

Cada uno de estos ciclos consta de las siguientes fases:

- a) *Fase de desnaturalización*: consiste en la separación de las dos cadenas que forman el ADN molde; esto se consigue mediante la aplicación de temperaturas elevadas (entre 92 y 95° C) durante un periodo de tiempo que oscila de segundos a varios minutos. A estas temperaturas las moléculas de ADN se estiran y se desenlazan y los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas se rompen. De esta manera las cadenas quedan expuestas a la unión con los cebadores específicos.
- b) *Fase de unión a cebadores o annealing o fase de anillamiento*: en esta fase los cebadores se unen a las cadenas de ADN complementarias, en los extremos de las secuencias que necesitamos amplificar. Esta reacción se lleva a cabo a una temperatura específica, llamada temperatura de anillamiento (o *T_m* del inglés *melting temperature*) que es específica de cada pareja de cebadores en función del contenido de sus bases, y que varía entre 45 y 70° C. Así por ejemplo, a mayor contenido de nucleótidos G-C en el cebador, más alta debe ser la temperatura para que tenga lugar la unión. Este fenómeno determina una mayor especificidad del proceso.
- c) *Fase de elongación o extensión*: en esta fase la enzima polimerasa añade nucleótidos a las cadenas que se van sintetizando a partir de los extremos 3'-OH libres de los cebadores. La temperatura óptima para llevar a cabo esta reacción es de 72° C. La duración del proceso depende de la longitud del fragmento que se va a amplificar.

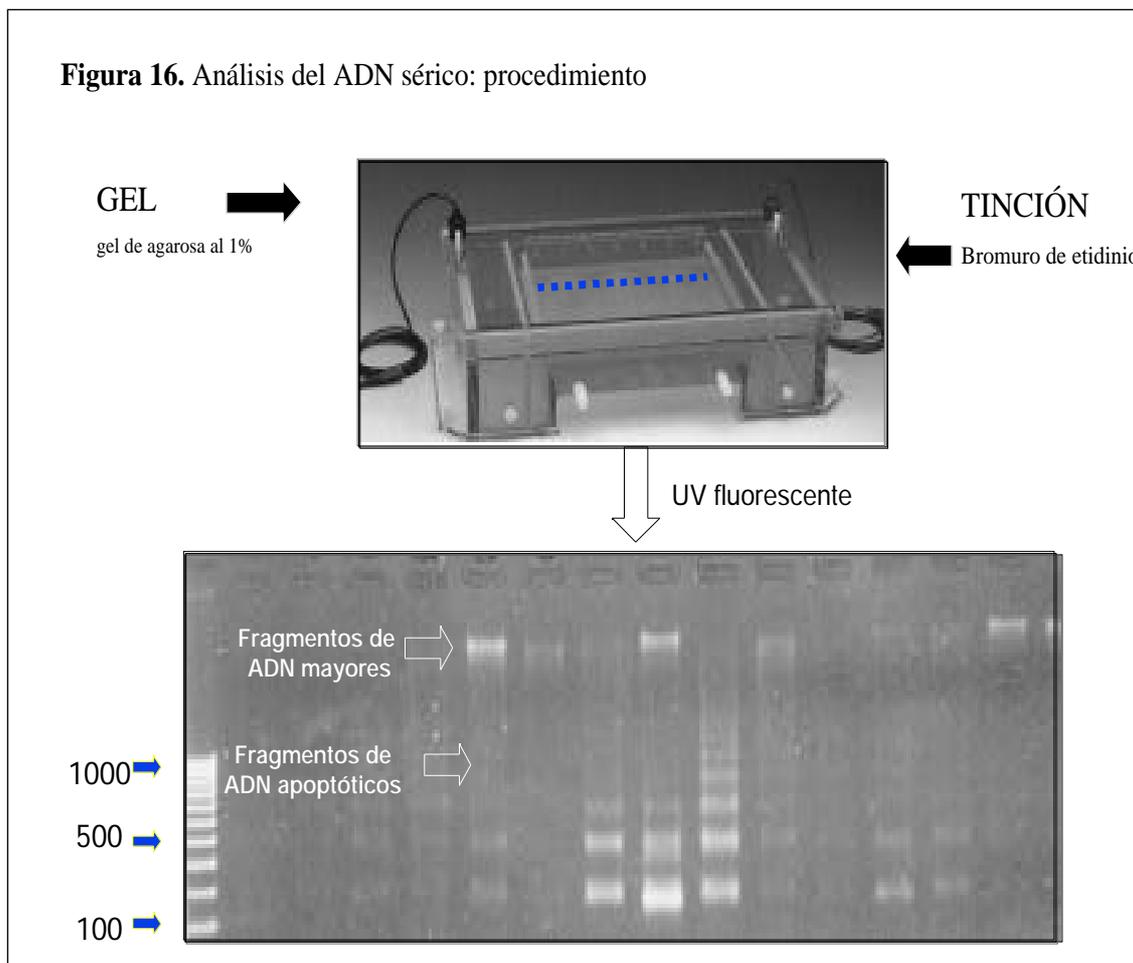
En la mayoría de las reacciones de amplificación se añade un último *paso de extensión* final a 72° C durante un tiempo aproximado de 3 a 10 minutos. Este paso sirve para aquellos fragmentos o cadenas de nueva síntesis cuya extensión todavía no ha sido analizada.

Estas tres fases forman ciclos que se repetirán sucesivamente en un número determinado de ocasiones (en general, entre 25 y 40 veces) lo que permitirá la obtención de un gran número de copias de la región de ADN amplificada.

Las condiciones de la PCR que se realizó en nuestro laboratorio fueron las siguientes: desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, 35 ciclos a 95,4° C de 30 segundos; 60° C un minuto y 72° C durante 90 segundos, seguidos de una extensión final a 74° C durante 7 minutos.

3.4.4. Electroforesis del producto amplificado

La electroforesis del producto obtenido por PCR permite comprobar que los fragmentos de ADN han sido amplificados, y descarta la existencia de bandas inespecíficas que no se correspondan con el peso del fragmento de ADN que se quiere estudiar. Se puede realizar sobre un gel de agarosa o de acrilamida. En este estudio se utilizó un gel de agarosa al 1% en el cual las muestras y el control negativo (consistente en la sustitución del ADN molde por un volumen igual a la del agua DEPC estéril utilizada en la amplificación), fueron sometidas a electroforesis durante 1 hora a 72V. Transcurrido dicho tiempo, el gel se tiñe con bromuro de etidio durante 10 minutos para visualizar las bandas del producto amplificado. Posteriormente, los geles son colocados sobre un transiluminador de luz ultravioleta, siendo visualizados y fotografiados con película Polaroid® D-669 (Figura 16).



3.4.5. Purificación de la PCR

Los productos de la PCR se purificaron antes de utilizarse para la secuenciación. Se utilizó un *kit* comercial (Usb, USA) que contenía dos enzimas fundamentales: (1) exonucleasa 1 (10U/ μ l en 20mM Tris-HCL, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 50% glicerol) y (2) una fosfatasa alcalina (2U/ μ l en 25mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 50% glicerol). Cada tubo contiene 10 μ l del producto de la PCR, 4 μ l de exonucleasa 1, y 4 μ l de fosfatasa alcalina. La mezcla se incubó a 37° C durante 45 minutos y las enzimas se inactivan por calor a 80° C durante 15 minutos en un cicladador térmico (GeneAmp PCR System 9700m, Perkin Elmer, USA).

3.4.6. Análisis y secuenciación del ADN genómico

Toda la secuenciación del ADN se realizó con un *primer* marcado con fluorescente y en un secuenciador de la casa comercial Pharmacia Biotech (Figura 17, ALFwin Express Sequencer, Sweden). Un total de 8 reacciones de secuenciación se realizaron hasta secuenciar los 445 aminoácidos del gen de la tubulina (Tabla 17).

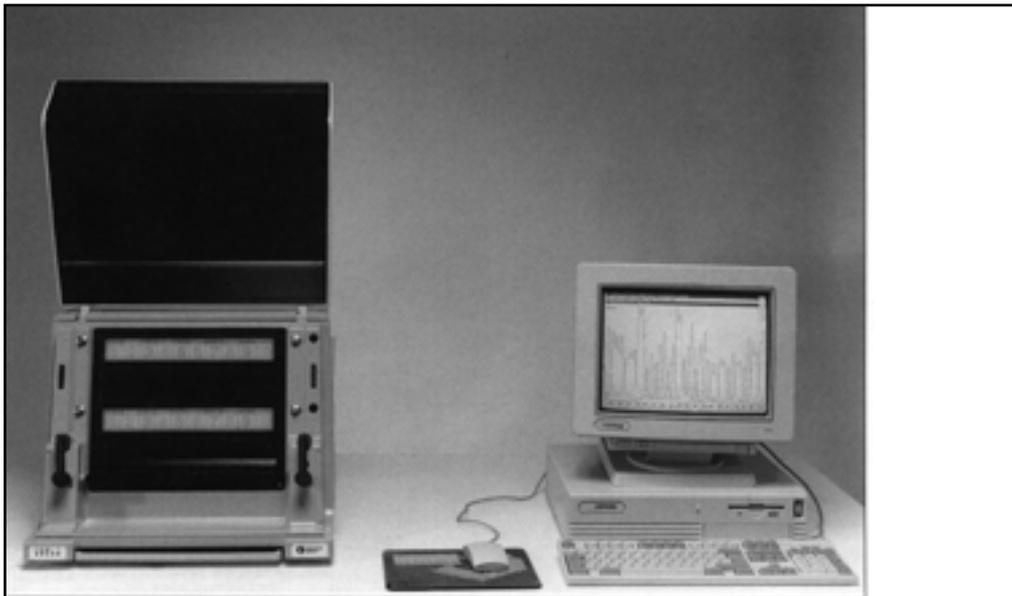
Tabla 17. Secuenciación del ADN genómico					
<i>Exón</i>	<i>Parte</i>	<i>Nombre del primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Sentido</i>	<i>T_m</i>
1		TS0362	TTTTCATAACTTACCTGGATTTTT	Reverse	52.8°C
2		TS2360	ATAAGTGGGAGACAGGGAAGGGAA	Reverse	63.9°C
3		TS2491	CAAGTCTCTGATCCCTGCTGTCTC	Forward	62.5°C
4	1	TS2955	ATCTTCCATACCCTGTTAATTAGCTT	Forward	60°C
	2	TS3190	CAGCAAGATCCGAGAAGAATACCCT	Forward	63.7°C
	3	TS3430	TGTCACCACCTGCCTCCGTT	Forward	64.7°C
	4	TS3661	CGTGGCTGCTGTCTTCCGTGG	Forward	69.2°C
	5	TS3856	CTTCAAGCGCATCTCGGAGCAG	Forward	68°C
<i>T_m</i> = melting temperature o temperatura de fusión					

Las condiciones de PCR para cada *primer* fueron: desnaturalización a 95° C durante 5 minutos y 25 ciclos de: (1) desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, (2)

anillamiento a temperatura de fusión durante 30 segundos, (3) primera extensión a 72° C durante 45 segundos seguido de una auto-extensión final a 72° C durante 10 minutos. La reacción de secuenciación se realizó con un *kit* de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech, de Suiza.

La secuenciación se llevó a cabo en 4 tubos separados (uno para cada nucleótido A, C, G y T) en 25 ciclos. Se añade tinción con formamida y fucsina a cada tubo y la muestra se extiende en un gel de acrilamida al 8% que es preparado según el sistema Reprogel (Amersham Pharmacia). Este sistema puede leer entre 400 y 700 pares de bases razonablemente bien, y a una frecuencia de aproximadamente 1 par de base por minuto.

Figura 17. Secuenciador de la casa comercial Pharmacia Biotech (ALFwin Express Sequencer, Sweden).



El ADN sérico de los pacientes afectados de cáncer de pulmón de célula no pequeña se comparó con la secuencia del gen de la M40 -tubulina del GenBank (número de acceso: J00314). La secuencia también se comparó con el ADN de los linfocitos, del tejido pulmonar sano y del suero de los sujetos sanos.

3.4.7. PROTOCOLOS DE LABORATORIO

A. PURIFICACIÓN DEL ADN SÉRICO CON QIAamp® DNA MINI KIT

QIAamp® DNA blood Mini Kit (50 muestras): QIAGEN (Izasa) Ref # 51104

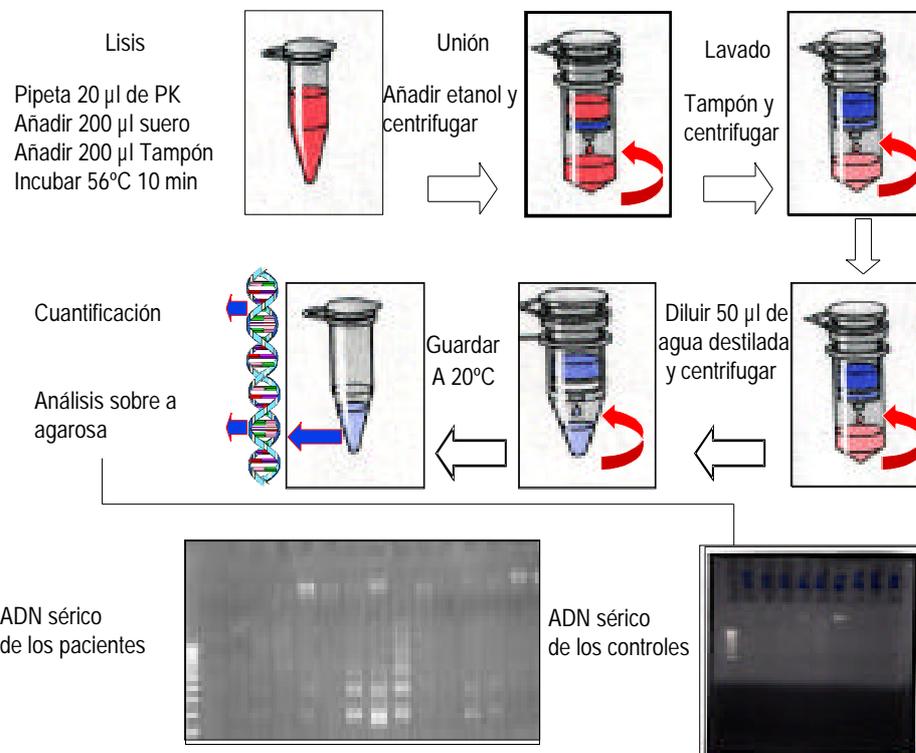
QIAamp® DNA blood Mini Kit (250 muestras): QIAGEN (Izasa) Ref # 51106

PROCEDIMIENTO

1. Cargar 40 µl QIAGEN Protease (o Proteinasa K- stock de 20 mg/ml) en un tubo estéril de Eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 400 µl de suero en el tubo y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
3. Añadir 400 µl de tampón AL a la muestra. Mezclar mediante volteo durante 15 segundos.
4. Incubar a 55° C durante 1h 30 min.
5. Centrifugar brevemente el tubo de Eppendorf de 1.5 ml para extraer las gotas del interior de la tapadera.
6. Añadir 400 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar de nuevo con el torbellino durante 15 segundos. Tras el mezclado, centrifugar brevemente el tubo de 1.5 ml y extraer de nuevo las gotas del interior de la tapadera.
7. Aplicar cuidadosamente la mitad de la mezcla del paso 6 a la columna de giro QIAamp (en un tubo de 2ml) sin mojar el canto, cerrar la tapa, y centrifugar a 8.000 rpm durante 2 min. Colocar la columna de QIAamp en un tubo limpio de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.
8. Cuidadosamente aplicar el resto de la mezcla del paso 6 a la misma columna de QIAamp y repetir la centrifugación a 8.000 rpm durante 2 min. Colocar la columna de QIAamp en un tubo nuevo de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.
9. Abrir cuidadosamente la columna de QIAamp y añadir 500 µl de tampón AW1 sin mojar el canto. Cerrar la tapa y centrifugar a 8.000 rpm durante 2 min. Colocar la columna de QIAamp en un tubo nuevo de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.

10. Abrir cuidadosamente la columna de QIAamp y añadir de 500 μ l de tampón AW2 sin mojar el canto. Cerrar la tapadera y centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min.
11. Colocar la columna de QIAamp en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Cuidadosamente abrir la columna de QIAamp y añadir 70 μ l de agua de DEPC precalentada a 55° C
12. Incubar a 55° C durante 5 min. Guardar a temperatura ambiente durante 5 min.
13. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min.
14. Desechar la columna de QIAamp e incubar el tubo a 37° C durante la noche.
15. Incubar a 65° C durante 5 min. Agitar brevemente y guardar en hielo durante 5 minutos. Se almacena a 4° C o a -20° C si es durante mucho tiempo.

Figura 18. Esquema gráfico del aislamiento del ADN genómico de las muestras del suero



16.

B. AISLAMIENTO DE ADN DE TEJIDO CON QIAamp® DNA MINI KIT

QIAamp® DNA blood Mini Kit (50 muestras): QIAGEN (Izasa) Ref # 51104

QIAamp® DNA blood Mini Kit (250 muestras): QIAGEN (Izasa) Ref # 51106

PROCEDIMIENTO

1. Cortar la muestra de tejido (aproximadamente 25 mg) en piezas pequeñas y añadir 180 µl de ATL (tampón de lisis tisular- QIAGEN ref. # 19076-).
2. Añadir 40 µl de QIAGEN Protease (o proteinasa K-20mg/ml-) a un tubo de Eppendorf de 1.5 ml. Incubar a 55° C durante la noche (si es posible voltear ligeramente cada 2 o tres horas).
3. Girar levemente y añadir 200 µl de tampón AL a la muestra. Mezclar mediante volteo durante 15 segundos.
4. Guardar a 70° C durante 10 min.
5. Añadir 200 µl de etanol absoluto y voltear durante 15 segundos.
6. Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 5 a la columna de QIAamp (en un tubo de 2 ml) sin mojar los cantos, cerrar la tapadera, y centrifugar a 8.000 rpm durante 2 min. Colocar la columna de QIAamp en un tubo limpio de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.
7. Abrir cuidadosamente la columna de QIAamp y añadir 500 µl de tampón AW1 sin tocar el canto. Cerrar la tapadera y centrifugar a 8.000 rpm durante 2 min. Colocar la columna de QIAamp en un tubo de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.
8. Abrir cuidadosamente la columna de QIAamp y añadir 500 µl de tampón AW2 sin tocar los cantos. Cerrar la tapadera y centrifugar a 14.000 rpm durante 3 min.
9. Colocar la columna de QIAamp en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Abrir cuidadosamente la columna de QIAamp y añadir 100 µl de agua DEPC precalentada a 55° C.
10. Incubar a 55° C durante 5 min. y guardar a temperatura ambiente durante 5 min.
11. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min.

12. Desechar la columna de QIAamp e incubar el tubo de Eppendorf de 1.5 ml a 37° C durante la noche.
13. Incubar a 65° C durante 5 minutos y girar levemente. Guardar en hielo durante 5 minutos y finalmente almacenar a 4° C o a -20° C si es durante mucho tiempo.

C. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA SANGUÍNEA: SUERO Y POBLACIÓN LINFOCITARIA

C.1. AISLAMIENTO DEL SUERO

1. Recoger las muestras sanguíneas de cada paciente en tubos de 10 ml con gel SST y activador de la coagulación (*ref.- 368510 Becton Dickinson Systems UK*).
2. Guardar los tubos en posición vertical durante al menos una hora a temperatura ambiente hasta que se organice el coágulo.
3. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Transferir el suero (*sobrenadante*) a un nuevo tubo estéril.
5. Centrifugar de nuevo a 2.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para detectar las células que persistan en el suero aislado.
6. Almacenar a -20°C hasta su uso o proseguir con la extracción de ADN.

C. 2. AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS PERIFÉRICAS

1. Recoger las muestras sanguíneas de cada paciente en tubos de 3 o 10 ml con K_3EDTA (tubo lavanda) (3ml-*ref. #367652#*- o 10 ml -*ref. #368457#* Becton Dickinson System UK)
2. Centrifugar a 2.500 rpm durante 15 min. a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
3. Transferir las muestras de sangre a tubos estériles de 20 ml y añadir 2-3 volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos (155 mM NH_4CL -8.3 g/l-, Hepes 10 mM -10 ml 1M7L-, pH 7.0).
4. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 10 min. sobre una plataforma balanceante.
5. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Desechar el sobrenadante cuidadosamente.
7. Eliminar el “pellet” con 1 ml (en tubos de 3 ml) o 4-5 ml (en tubos de 10 ml) de tampón de lisis de eritrocitos y licuar en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml.
8. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante con una pipeta.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento automático de los datos, se diseñó una base de datos utilizando el programa DBASE IV en el sistema operativo Microsoft MS-DOS. Los cálculos estadísticos para el análisis de los datos, se realizaron con el paquete de programas SPSS versión 9.0 para Windows.

3.5.1. Estadística descriptiva

Todas las variables fueron tratadas como variables categóricas, excepto la edad al diagnóstico y la concentración de ADN en suero, que se analizaron como variables cuantitativas.

Para cada una de las variables cualitativas, se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de presentación.

Para las variables cuantitativas se procedió al cálculo de estadísticos de tendencia central y dispersión, expresados mediante la media, la mediana y la desviación típica y recorrido.

3.5.2. Estadística inferencial

La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante la creación de tablas de contingencia que posteriormente fueron sometidas al test de hipótesis de Chi-cuadrado con la corrección de Yate o prueba exacta de Fisher.

Las asociaciones univariantes entre la presencia o ausencia de mutación del gen de la β -tubulina y los factores pronósticos basales se analizaron con el test exacto de Fisher.

Las variables continuas con una distribución no-normal se compararon mediante el test de Mann-Whitney U.

3.5.3. Análisis de supervivencia

Para el estudio de la interacción de las diferentes variables con el tiempo de *supervivencia global*, definido como el tiempo transcurrido desde el primer tratamiento recibido hasta la muerte del paciente o fin del estudio (30 de marzo de 2000), y *tiempo hasta la progresión*, definido como el tiempo transcurrido desde el primer tratamiento hasta la recidiva o progresión de la enfermedad, se realizó siguiendo el modelo de Kaplan-Meier.

Para la comparación entre las curvas de supervivencia, se utilizaron las pruebas de log-rank , Breslow y Tarone-Ware.

3.5.4. Estudio multivariante

El modelo de regresión múltiple de Cox, se aplicó con la finalidad de aislar grupos de variables (covariables) que tuvieran relación con al supervivencia y el tiempo hasta la progresión.

Tanto en el caso de test de hipótesis, como en el modelo Cox, se tomó como nivel de significación un valor igual o menor del 5% ($\alpha = 0.05$) y una potencia para test bilateral del 80% ($1 - \beta = 0.8$).

La totalidad de las valoraciones estadísticas han sido realizadas por el Doctor José Javier Sánchez, al cual va dirigido este agradecimiento.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Se ha estudiado una serie de 52 pacientes intervenidos de cáncer de pulmón de célula no pequeña, atendidos en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, y que provienen de la región sanitaria del Maresme y del Barcelonés Nord. Asimismo, se ha recogido muestra sanguínea de 112 individuos sanos de la misma área geográfica, utilizada como control.

La Tabla 18 resume las características clínicas más importantes de los 52 pacientes del estudio.

Las variables que se señalan y los criterios de valoración son los descritos en el apartado de *Pacientes y Métodos*.

El grupo de pacientes es relativamente joven. La mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico es de 57.5 años, con un recorrido entre 35 y 79 años.

La mayoría de los pacientes pertenecen al sexo masculino (94.2%) y tan sólo hay tres mujeres (5.8%) en la población de estudio.

En la evaluación del estado basal del paciente (*performance status*), tres pacientes (5.8%) presentaban un *performance status* de 2, y el restante (94.2%) un *performance status* de 0 o 1. Es decir, la mayor parte de la serie son pacientes de manejo ambulatorio.

Una pérdida ponderal mayor del 5% en los últimos 6 meses al diagnóstico se presenta en un 21.2% del total de los pacientes. El tabaquismo como factor de riesgo, se demuestra en la mayoría de los pacientes (94.2%).

Por estadio clínico-quirúrgico de la enfermedad y según la clasificación TNM modificada por *Mountain* en 1997, los pacientes se distribuyen de la siguiente manera: 7 pacientes (13.5%) presentan un estadio patológico IA, 17 pacientes (32.7%) un estadio

IB, 2 pacientes (3.8%) un estadio IIA, 10 (19.2%) estadio IIB, y finalmente 16 pacientes (30.8%) un estadio IIIA.

Tras la intervención quirúrgica el estudio histológico muestra un predominio del tipo carcinoma escamoso (44.2%), seguido del tipo adenocarcinoma (34.6%) y por último de carcinoma de célula grande (21.2%).

Respecto al grado de diferenciación histológica, *grado 1* de diferenciación o bien diferenciado, se presenta en 4 pacientes (8% de la serie); *grado 2* o moderadamente diferenciado en 19 pacientes (37%); *grado 3* de diferenciación o pobremente diferenciado en 23 pacientes (44%); y no pudo ser determinado en 6 pacientes (11% del total).

De la serie total de 52 pacientes, previamente a la cirugía recibieron quimioterapia con intención neoadyuvante 13 pacientes (25%), 9 de ellos con un triplete formado por cisplatino, gemcitabina y docetaxel, y el resto con una doble combinación de platino (cisplatino y gemcitabina, paclitaxel y carboplatino, cisplatino y etopósido).

El tipo de cirugía predominante fue la lobectomía que se realizó en 34 pacientes (65.4%). A continuación por orden de frecuencia se practicó neumonectomía en 14 pacientes (27%) y en el grupo restante, se practicaron segmentectomía o una resección atípica pulmonar (7.6%).

Tras la cirugía inicial, 10 pacientes recibieron quimioterapia adyuvante posterior, bien por considerarse la cirugía incompleta o no radical (márgenes quirúrgicos afectos o afectación histológica ganglionar mediastínica alta) o bien por considerarse que presentaban criterios de alto riesgo de recidiva (edad joven, gran tamaño tumoral, invasión perineural, linfática o vascular en el estudio histológico de la pieza). El esquema de quimioterapia empleada fue variable según el protocolo asistencial del Servicio de Oncología Médica en aquel momento: cisplatino y vinorelbina, carboplatino y paclitaxel, cisplatino y gemcitabina y finalmente también se utilizó docetaxel en monoterapia.

Tras la cirugía inicial y en un intervalo intermedio de 4-6 semanas, 27 pacientes (52%) recibieron radioterapia adyuvante mediante acelerador lineal, sobre mediastino y lecho quirúrgico tumoral, con una dosis total que variaba entre 55 y 66 Gy.

4.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN TUMORAL.

La extracción de ADN sérico se realizó entre octubre de 1998 y marzo de 1999 según el método descrito en el apartado de *Pacientes y Métodos*.

La concentración media de ADN sérico fue de 3.6 µg/ml (con un recorrido entre 0.4 y 7.6 µg/ml) en los individuos del grupo control y de 7.5 µg/ml (con un recorrido entre 1.2 y 33 µg/ml) en el grupo de pacientes intervenidos de cáncer de pulmón de célula no pequeña ($p= 0.0001$). Respecto a los diferentes estadios (I-III A) de cáncer de pulmón estudiados, no se han encontrado diferencias en la concentración sérica de ADN. Asimismo, la concentración media de ADN en los pacientes con mutaciones del gen de la α -tubulina era similar a la concentración media de los pacientes que no presentaban dicha mutación: 5.8 µg/ml para aquellos pacientes sin mutación de la α -tubulina (recorrido entre 1.2 y 19 µg/ml) y 6 µg/ml para los pacientes afectados de la mutación (recorrido entre 0 y 33 µg/ml), siendo esta pequeña diferencia no significativa entre ambos grupos (Tabla 19 y Figura 19).

4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MUTACIONES

De los 52 pacientes estudiados para la cuantificación y determinación de mutaciones del gen de la α -tubulina, el 40.4% (21 pacientes) presentaba mutaciones de dicho gen, todas ellas localizadas en el exón 4, exón que se extiende entre los residuos 93 y 445 (Tabla

20). No se encontró mutación del gen de la α -tubulina en ninguna de las 30 muestras (linfocitos, tejido sano y suero) estudiadas como método de control.

Las mutaciones se localizaron en dos regiones principales que se llamaron Región 1 y Región 2 por conveniencia del estudio. La *Región 1* incluye los codones localizados entre 102 - 264 y la *Región 2* incluye los codones 277 - 425. El modelo molecular de la tubulina manifiesta que ambas regiones difieren en el modo de agruparse en la tubulina. Las mutaciones situadas en la Región 1 se localizan cerca de la zona de unión al GTP y de la zona de unión al taxano, así como de la hélice H7. Sin embargo, las mutaciones localizadas en la Región 2 se confinan en la superficie de la proteína. En la serie de estudio, 11 pacientes presentaron mutaciones en la Región 1 y los restantes 10 pacientes, presentaron la mutación en la Región 2.

Las mutaciones fueron del tipo *missense* en el 95% de los casos (20 pacientes del total de 21) y del tipo *nonsense* en el 5% restante (1 paciente). Aproximadamente la mitad de los casos fue una mutación tipo transición (cambio de una purina por otra distinta, o de una pirimidina por otra diferente) y la otra mitad una mutación tipo transversión (cambio de una purina por una pirimidina o viceversa).

Se han descrito diferentes patrones de alteraciones genéticas en pacientes no fumadores con adenocarcinoma de pulmón así como una asociación con el sexo del paciente, sin embargo en nuestro estudio no hubo ninguna relación entre la presencia de mutaciones del gen de la α -tubulina y el hábito tabáquico de los pacientes, el sexo, ni con las demás características basales (Tabla 21). Tampoco hubo relación ninguna entre la localización de la mutación en la Región 1 ó 2 del gen de la α -tubulina (Tabla 22) y las características clínicas de los pacientes (edad, sexo...).

De los 19 pacientes de los que disponíamos de tejido pulmonar del tumor primario (Tabla 23), se encontraron mutaciones en el gen de la α -tubulina en cinco de dichos pacientes (en la tabla con las numeraciones 1, 2, 5, 8 y 19). Tal y como se observa en la tabla, tres de estos pacientes (los numerados 1, 5 y 19) no presentaban mutaciones en la determinación del ADN sérico, y durante el seguimiento clínico no mostraron recidiva

tumoral, permaneciendo todos ellos vivos en el momento del análisis de supervivencia. En los otros dos pacientes (en la tabla con los números 2 y 8) las mutaciones de la α -tubulina del tejido tumoral primario persistieron en el ADN sérico, a pesar de la quimioterapia adyuvante, que en estos dos casos se realizó con taxanos, y los pacientes desarrollaron metástasis a distancia durante el seguimiento evolutivo.

De los 14 pacientes restantes de los que disponíamos tejido primario tumoral que no presentaban mutación del mismo, cuatro pacientes presentaban mutaciones del gen de la α -tubulina en el ADN sérico y no la presentaban en el tumor primario (pacientes de la tabla 3, 6, 12 y 14), y 10 pacientes no presentaban mutaciones ni en el suero ni en el tumor primario (pacientes con numeración 4, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, y 18).

Merece la pena mencionar que tres pacientes presentaban mutación en el tejido primario pulmonar en el codón 180 con el consiguiente cambio de aminoácido de Valina a Isoleucina (Val:180:Ile). El significado de este hallazgo se comentará en el apartado de *Discusión* más adelante.

4.4 ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

La supervivencia mediana (Tabla 24) de este grupo fue de 61.7 meses para los once pacientes que presentaban la mutación en la Región 1 del gen de la α -tubulina, mientras que no se ha alcanzado para el grupo de pacientes con mutación en la Región 2. Hubo una fuerte tendencia hacia una mejor supervivencia en aquellos pacientes que presentaban la mutación en la Región 2 que en los otros dos subgrupos pero que no alcanzó un valor estadísticamente significativo ($p= 0.07$).

Al finalizar todo el tiempo de seguimiento (última actualización el 30 de marzo de 2000), un total de doce pacientes (23%) han presentado recidiva y /o progresión de su enfermedad. El tiempo medio para la progresión ha sido de 15.7 meses (con un recorrido entre 4.2 y 72.2 meses). Nueve pacientes (17%) han fallecido y treinta y un

pacientes (60%) permanecen libres de enfermedad. La mediana de seguimiento del estudio es de 18.9 meses, con un intervalo entre 1 y 130 meses.

5. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 18. Características clínicas de la serie

<i>Características de los pacientes</i>	<i>N= 52</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Edad		
Mediana – años		57.5
Recorrido – años		35 – 79
Sexo		
Hombre	49	94.2
Mujer	3	5.8
ECOG (performance status)		
0/1	49	94.2
2	3	5.8
Pérdida de peso	11	21.2
Hábito tabáquico	49	94.2
Estadio TNM		
IA	7	13.5
IB	17	32.7
IIA	2	3.8
IIB	10	19.2
IIIA	16	30.8
Histología		
Escamoso	23	44.2
Adenocarcinoma	18	34.6
Célula grande	11	21.2
Mutaciones del gen de la γ -tubulina	21	40.4

ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group

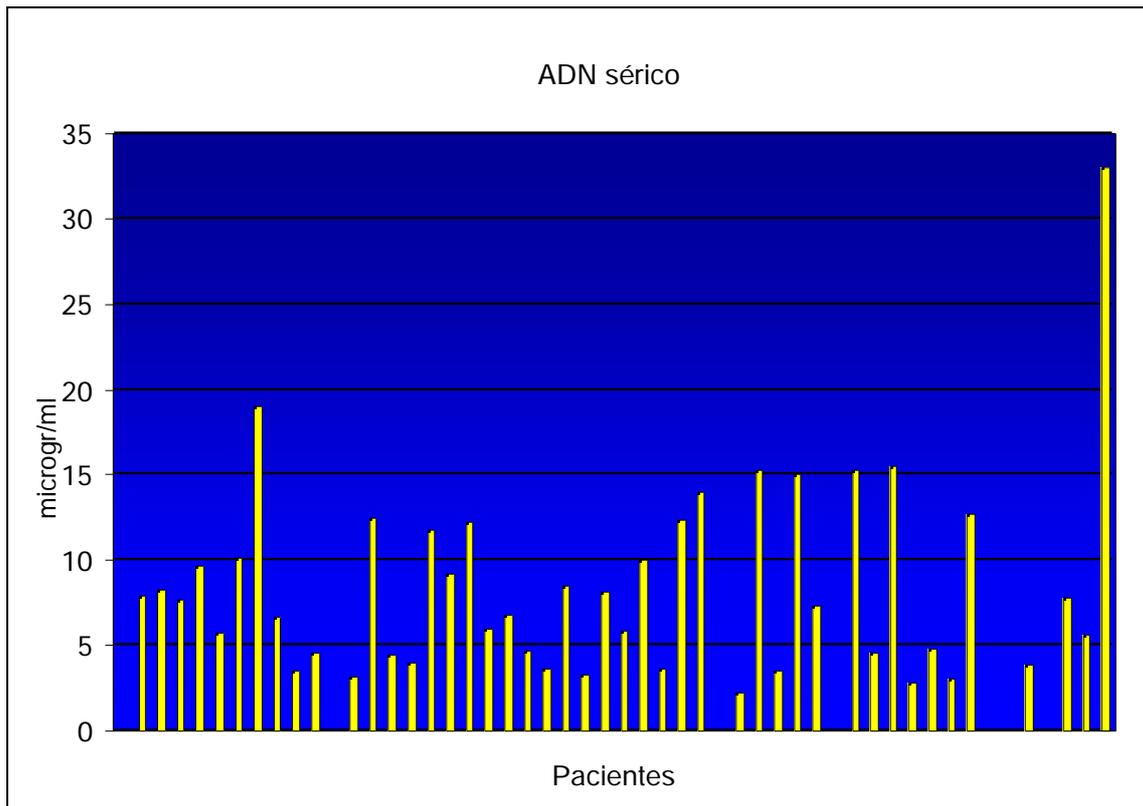


Figura 19 y Tabla 19. Concentración de ADN sérico de la muestra de estudio con 52 pacientes intervenidos de CPNM.

Tabla 19. Concentración de ADN sérico

<i>Sujetos</i>	<i>Número</i>	<i>Concentración media de ADN</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i>
Controles	112	3.6	
Pacientes	52	7.5	0.0001
-tubulina mutada	21	6	
-tubulina normal	31	5.8	< 0.1

Tabla 20. Mutaciones del gen de la α -tubulina en el suero de 21 pacientes de 52 intervenidos de cáncer de pulmón de célula no pequeña

<i>Paciente</i>	<i>Codón</i>	<i>Cambio de codón</i>	<i>Cambio de aa</i>
1	102	gcc-acc	Ala-Thr
2	158	gaa-gga	Glu-Gly
3	177	gac-tac	Asp-Tyr
4	180	gtc-atc	Val-Ile
5	180	gtc-atc	Val-Ile
6	180	gtc-atc	Val-Ile
7	203	gac-tac	Asp-Tyr
8	230	tca-cca	Ser-Pro
9	236	gtc-ttc	Val-Phe
10	247	aat-tat	Asn-Tyr
11	258	gtc-ggc	Val-Gly
12	310	tac-aac	Tyr-Asn
13	321	atg-att	Met-Ile
14	334	cag-tag	Gln-Stop
15	352	gcc-acc	Ala-Thr
16	355	gac-tac	Asp-Tyr
17	355	gac-cac	Asp-His
18	359	cgt-tgt	Arg-Cys
19	390	gcg-tgc	Arg-Cys
20	403	atg-atc	Met-Ile
21	422	tat-gat	Tyr-Asp

Las mutaciones de los pacientes con numeración del 1 al 11 se localizaron en la Región 1. Las mutaciones de los pacientes 12 al 21 se localizaron en la Región 2 del gen de la α -tubulina.

Nomenclatura de los aminoácidos: Phe= fenilalanina; Leu= leucina; Ser= serina; Tyr= tirosina; Cys= cisteína; Ile= isoleucina; Pro= prolina; His= histidina; Glu= glutamato; Arg= arginina; Met= metionina; Thr= treonina; Asn= asparagina; Lys= lisina; Val= valina; Ala= alanina; Asp= aspartato; Gln= glutamina; Gly= glicina

Tabla 21. Características clínicas de los 52 pacientes según la presencia o no de mutación del gen de la β -tubulina

	β -tubulina mutada		β -tubulina normal		<i>p</i>
	N	%	N	%	
Nº de pacientes	21	40.4	31	59.6	
Sexo					NS
Hombre	19	90.5	30	96.8	
Mujer	2	9.5	1	3.2	
Edad, años					NS
Recorrido	40 – 76		35 - 79		
Mediana	57		58		
ECOG o PS					NS
0/1	20	95.2	29	93.5	
2	1	4.8	2	6.5	
Pérdida de peso	5	23.8	6	19.4	NS
Hábito tabáquico	19	90.5	30	96.7	NS
Estadio					NS
IA	5	23.8	2	6.5	
IB	8	38.1	9	29	
IIA	1	4.8	1	3.2	
IIB	4	19	6	19.4	
IIIA	3	14.3	13	41.9	
Histología					NS
Escamoso	10	47.6	13	41.9	
Adenocarcinoma	7	33.4	11	35.5	
Célula grande	4	19	7	22.6	
Tumor primario					NS
T1	6	28.6	6	19.3	
T2	12	57.1	16	51.6	
T3	3	14.3	9	29	

PS= performance status; NS= estadísticamente no significativo

Tabla 22. Características clínicas de los pacientes según la presencia de mutación en la Región 1 o 2

	<i>Mutación</i>		<i>Mutación</i>		<i>p</i>	
	<i>Región 1</i>		<i>Región 2</i>			
	N	%	N	%		
Nº de pacientes	11	52	10	48		
Sexo					NS	
	Hombre	9	82	10	100	
	Mujer	2	18			
Edad (años)					NS	
	Recorrido	47 – 69		40 – 76		
	Mediana	56		60		
ECOG o PS					NS	
	0/1	9	82	10	100	
	2	2	18			
Pérdida de peso		3	27	2	20	NS
Hábito tabáquico		8	73	10	100	NS
Estadio					NS	
	IA	2	18	3	30	
	IB	4	37	4	40	
	IIA	1	9	0	0	
	IIB	3	27	1	10	
	IIIA	1	9	2	20	
Histología					NS	
	Escamoso	6	55	4	40	
	Adenocarcinoma	5	45	2	20	
	Célula grande	0	0	4	40	
Tumor primario					NS	
	T1	3	27	3	30	
	T2	6	55	6	60	
	T3	2	18	1	10	
Tipo mutación					NS	
	Missense	11	100	9	90	
	Nonsense	0	0	1	10	
Cambio de aminoácido					NS	
	Transición	6	60	3	30	
	Transversión	4	40	6	60	

Tabla 23. Mutaciones en el tumor primario y en el suero de 19 pacientes de la serie

<i>Paciente</i>	<i>Mutaciones en ADN tumoral</i>	<i>Tratamiento (fecha)</i>	<i>Extracción ADN sérico (fecha)</i>	<i>Mutaciones en ADN sérico</i>	<i>Evolución Clínica</i>	<i>Vivo / Fallecido</i>
1	180,222,403,417	VNR-DDP (15.2.99)	(24.2.99)‡	No	NED	V
2	180	GEM-DDP (9.6.99) PTX (25.10.99) PTX-Carbo (12.7.99) DXT (13.3.00)	(8.3.99)§	180	Met óseas y de partes blandas	F
3	No	GEM-DDP (15.6.99)	(24.3.99) § (11.10.99) ‡	333 No	NED	V
4	No	DDP-DXT-GEM (4.1.99) DXT (13.4.99) GEM (12.1.00)	(26.5.99) ‡	No	Met cutánea y ganglionar axilar	F
5	172	–	(26.4.99)	No	NED	V
6	No	GEM-DDP (18.12.98) PXT-DDP (27.5.99)	(28.5.99) ‡	310	Met adrenal y cerebral	V
7	No	–	(28.6.99)	No	NED	V
8	235	PXT-DDP (24.3.99) GEM-DDP (17.11.99)	(5.7.99) ‡	235	Met óseas	V
9	No	–	(12.7.99)	No	NED	V
10	No	DXT (30.12.99)	(12.7.99)§	No	Recidiva ganglionar mediastínica	V
11	No	DDP-DXT-GEM (2.6.99) DDP-GEM-DXT (26.8.99)	(5.7.99) ‡	No	NED	V
12	No	–	(2.8.99)	177	NED	V

13	No	GEM (21.9.99)	(17.8.99) §	No	Met óseas y adrenal	V
14	No	–	(25.8.99)	158	NED	V
15	No	PXT-Carbo (11.8.98)	(25.8.99) ‡	No	Met ganglionar retroperitoneal	F
		PXT-Carbo (18.2.99)				
		GEM-DDP (7.2.00)				
16	No	DDP-VBL (19.3.97)	(25.8.99) ‡	No	Met cerebral	V
		PXT-Carbo (1.3.99)				
		GEM (26.11.99)				
		DXT (31.4.00)				
17	No	–	(6.9.99)	No	NED	V
18	No	DDP-DXT-GEM (11.1.99)	(20.9.99) ‡	No	NED	V
		GEM-DDP (14.6.99)				
19	180	–	(11.10.99)	No	NED	V

VNR, vinorelbina; DDP, cisplatino; GEM, gemcitabina; PTX, paclitaxel; Carbo, carboplatino; DXT, docetaxel; VBL, vinblastina; NED, no evidencia de enfermedad; Met, metástasis; V, vivo; F, fallecido.

§ muestras séricas obtenidas antes del inicio de la quimioterapia adyuvante

‡ muestras séricas obtenidas tras el inicio de la quimioterapia adyuvante

El resto de los pacientes no recibieron quimioterapia adyuvante

Tabla 24. Estudio estadístico de supervivencia

	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>IC 95%</i>	<i>12m</i>	<i>18m</i>	<i>24m</i>	<i>36m</i>	<i>p</i>
Estadio I-III A								
No mutado	31	NA	2.1-121.4	0.92	0.83	0.83	0.58	0.5
Región 1	11	61.7		1	1	0.85	0.64	
Estadio I-III A								
No mutado	31	NA		0.92	0.83	0.83	0.58	0.07
Región 2	10	NA		1	1	1	1	
Estadio I-III A								
Región 1	11	61.7	2.1-121.4	1	1	0.85	0.64	0.07
Región 2	10	NA		1	1	1	1	

Figura 20. Supervivencia en estadio I-III A según la presencia de mutaciones en la Región 1 o 2 de la β -tubulina ($p= 0.07$)

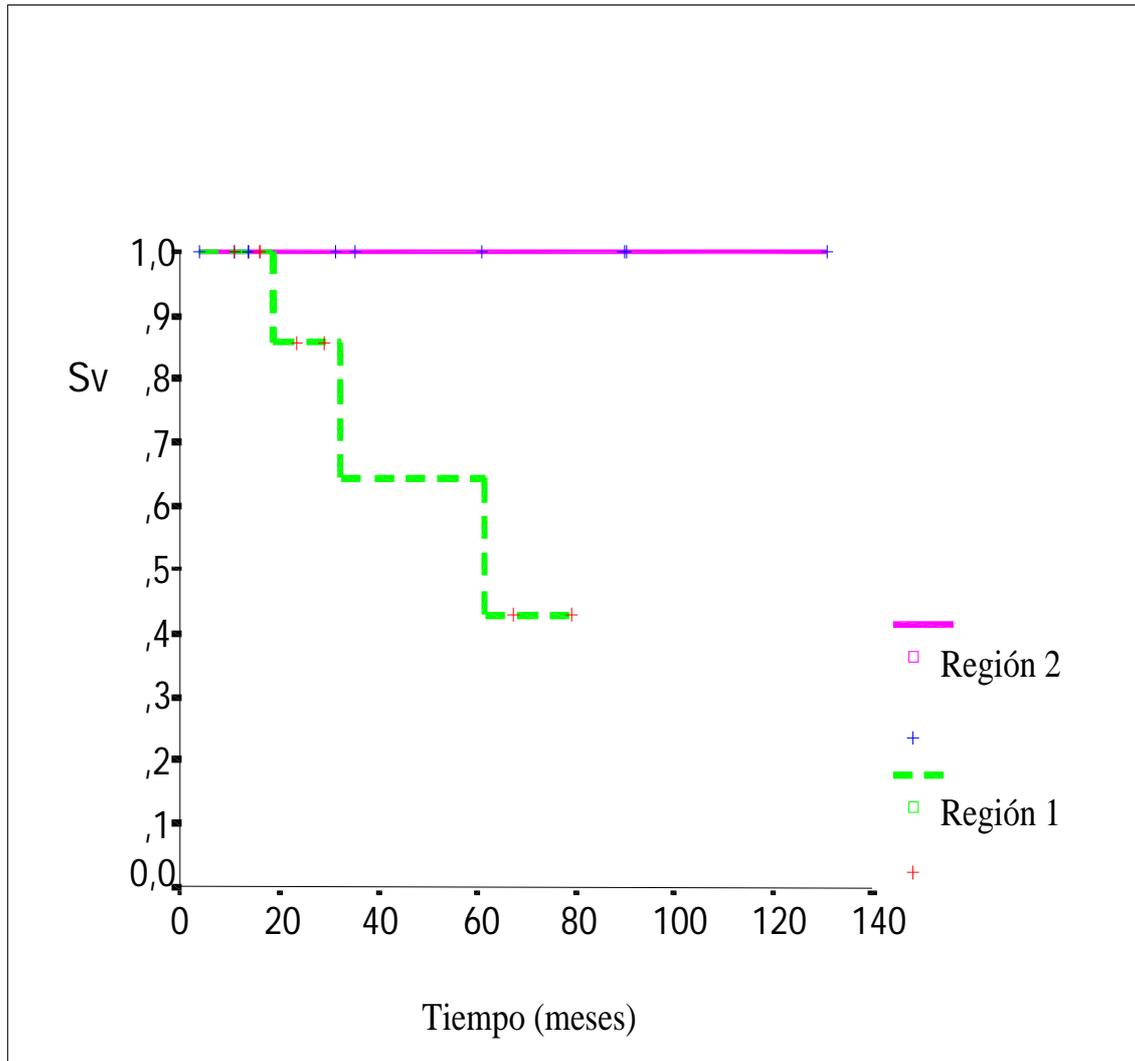


Figura 21. Supervivencia en estadio I-III A según la presencia o no de mutaciones en la Región 1 de la β -tubulina ($p= 0.5$)

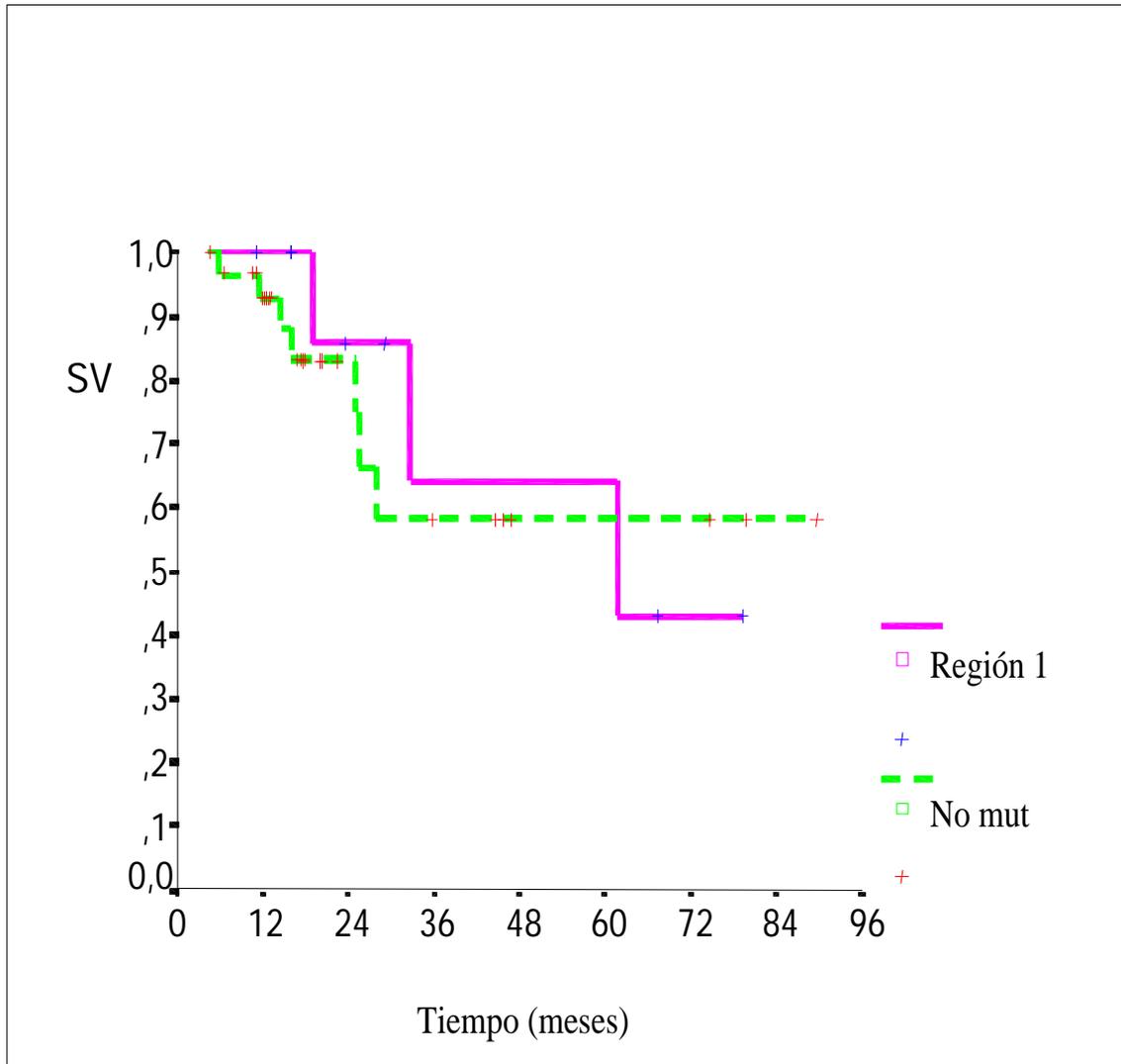
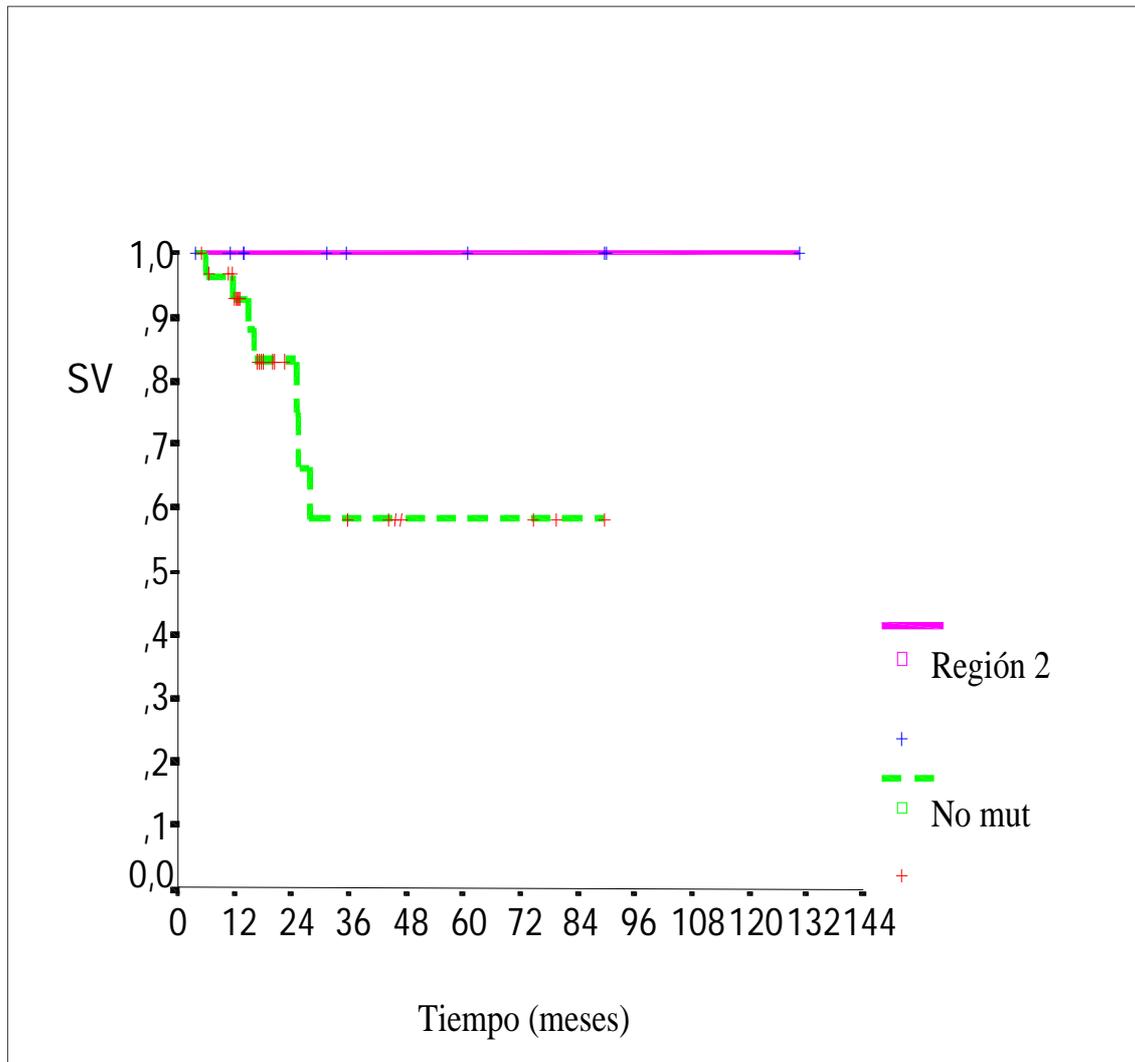


Figura 22. Supervivencia en estadio I-IIIa según la presencia o no de mutaciones en la Región 2 de la β -tubulina ($p= 0.07$)

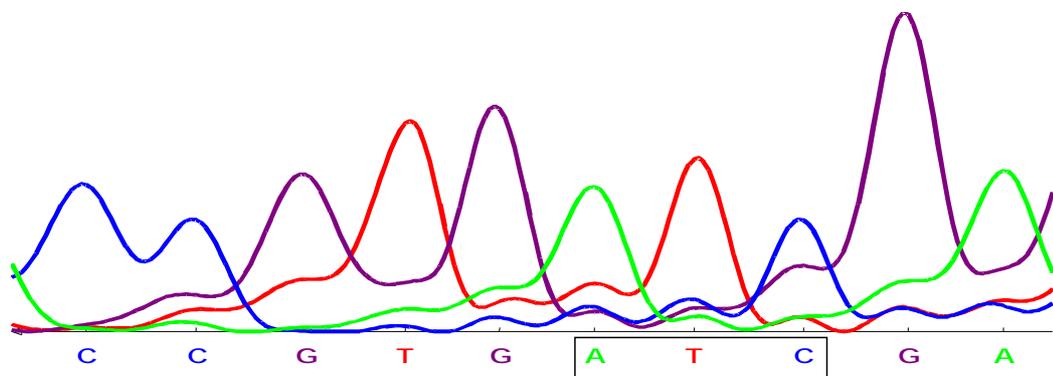


6. EJEMPLOS DE SECUENCIACIÓN

Figura 23. Análisis de secuenciación del ADN tras la amplificación por PCR
Val:180:Ile

- A) Codón 180 del paciente número 2. Un cambio de la base nitrogenada Guanina a Adenina (transición) provoca un cambio de aminoácido (Valina a Isoleucina) en el codón 180.
- B) Codón 180 *wild type*.

A)



B)

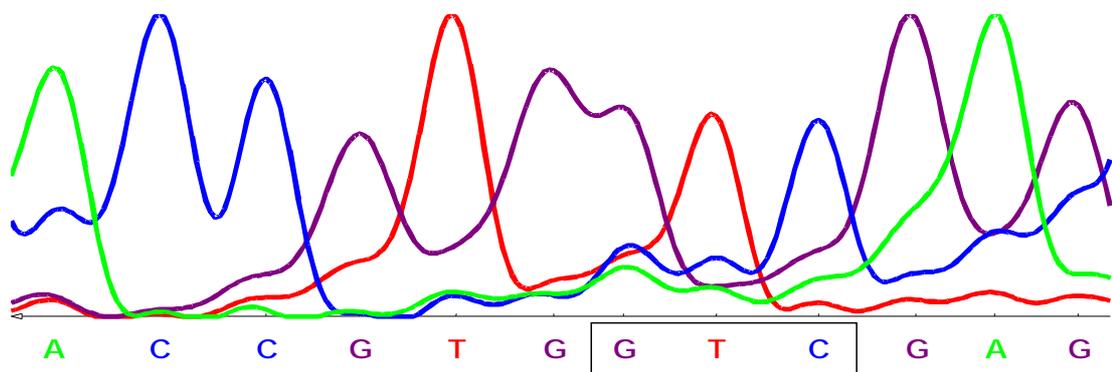


Figura 24. Análisis de secuenciación del ADN tras la amplificación por PCR
Tyr:422:Asp

- C) Codón 422. Un cambio de la base nitrogenada Timina a Guanina produce un cambio en el aminoácido de Tirosina a Ácido Aspártico.
- D) Codón 422 *wild type*.

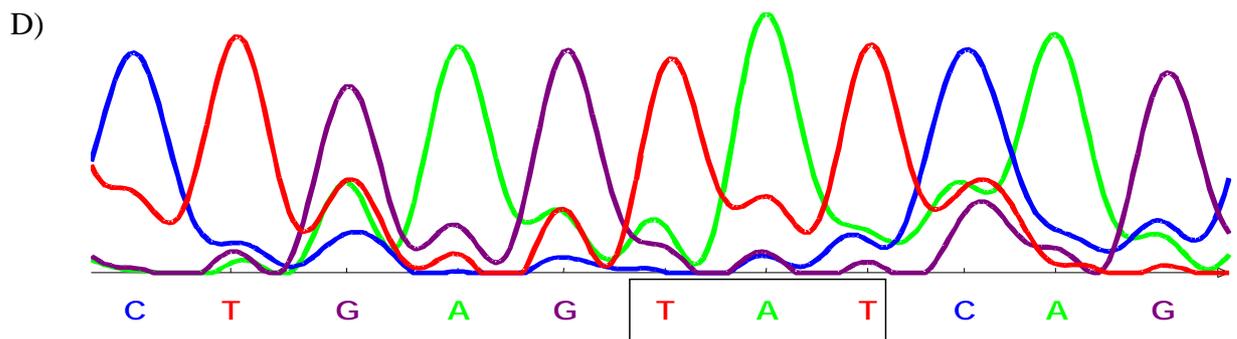
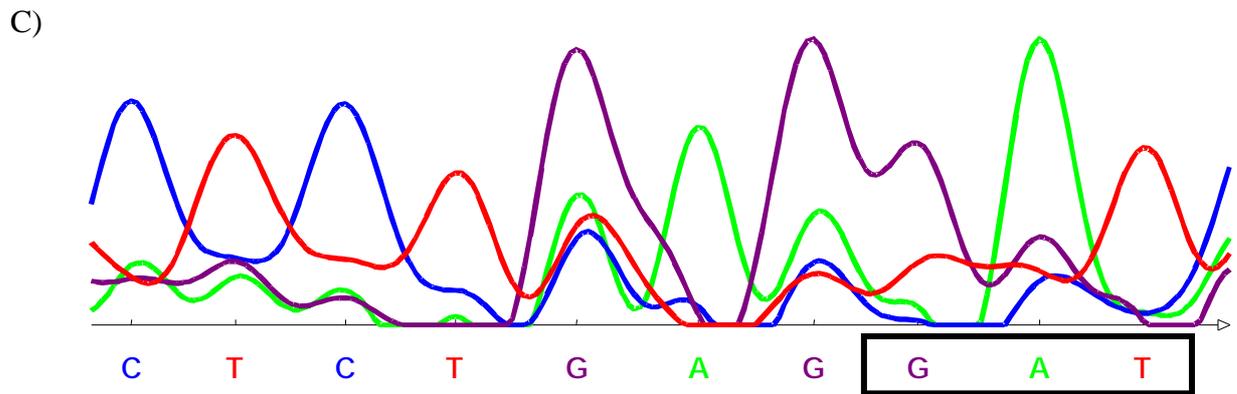


Figura 25. Análisis de secuenciación del ADN tras la amplificación por PCR
Asp:177:Tyr

- E) Codón 177. Un cambio de la base nitrogenada Guanina a Timina provoca un cambio de aminoácido (Ácido Aspártico a Tirosina) en el codón 177.
F) Codón 177 *wild type*.

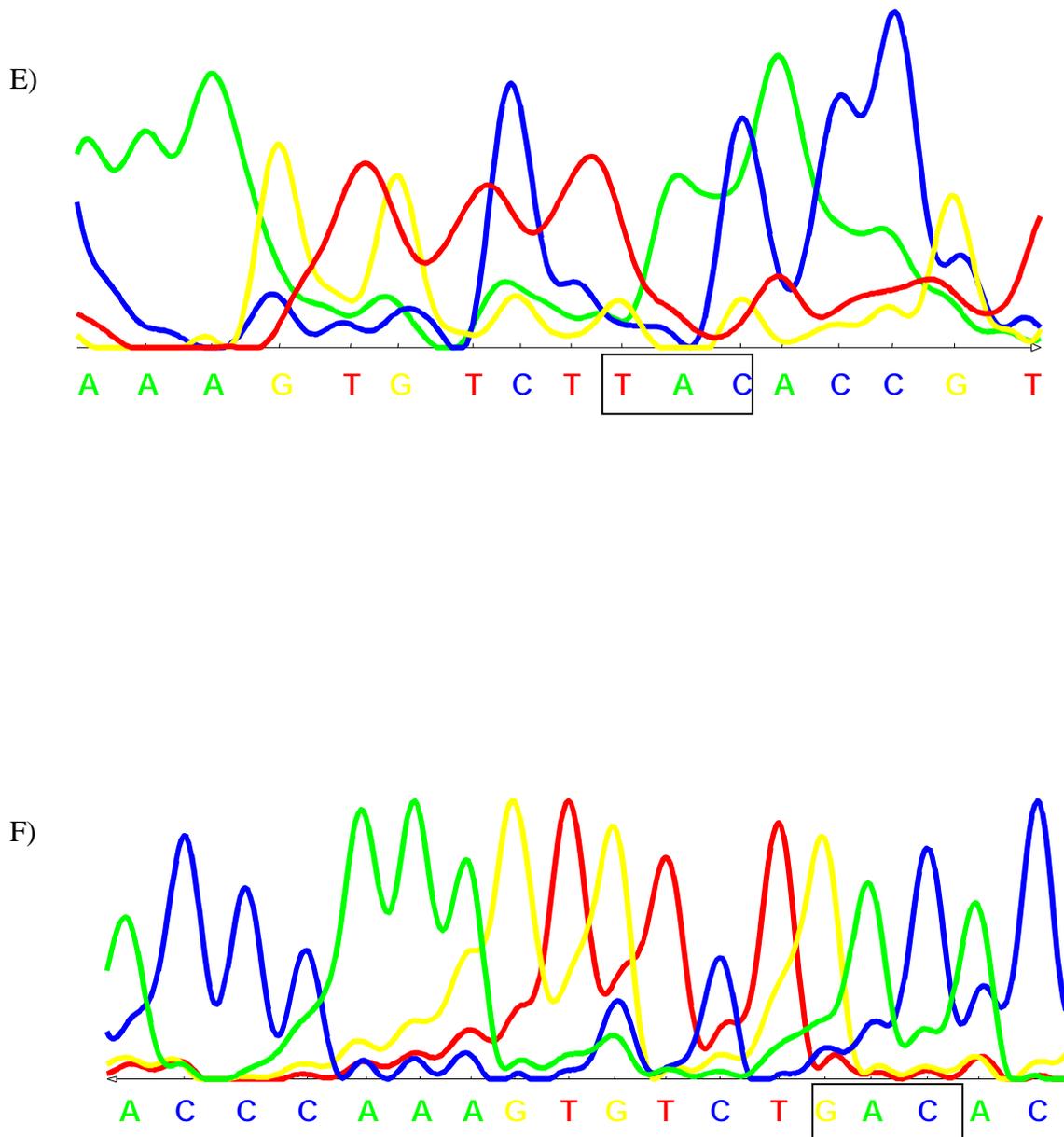
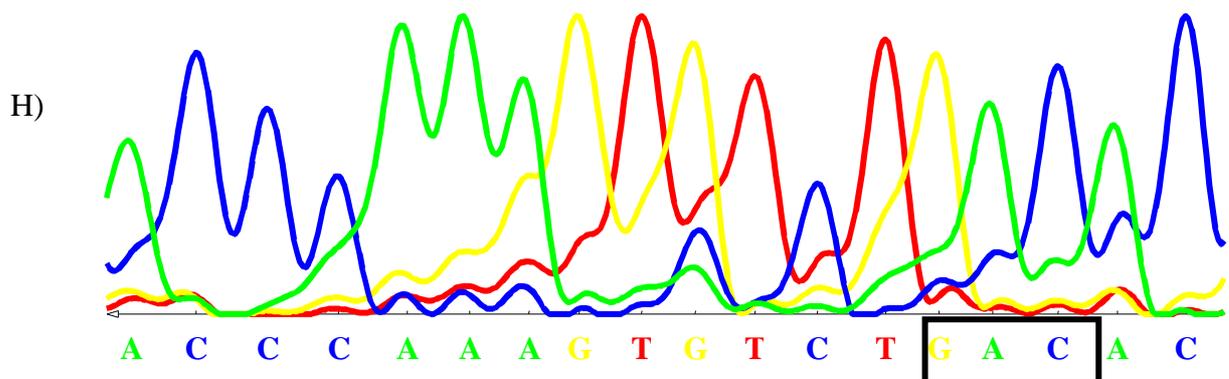
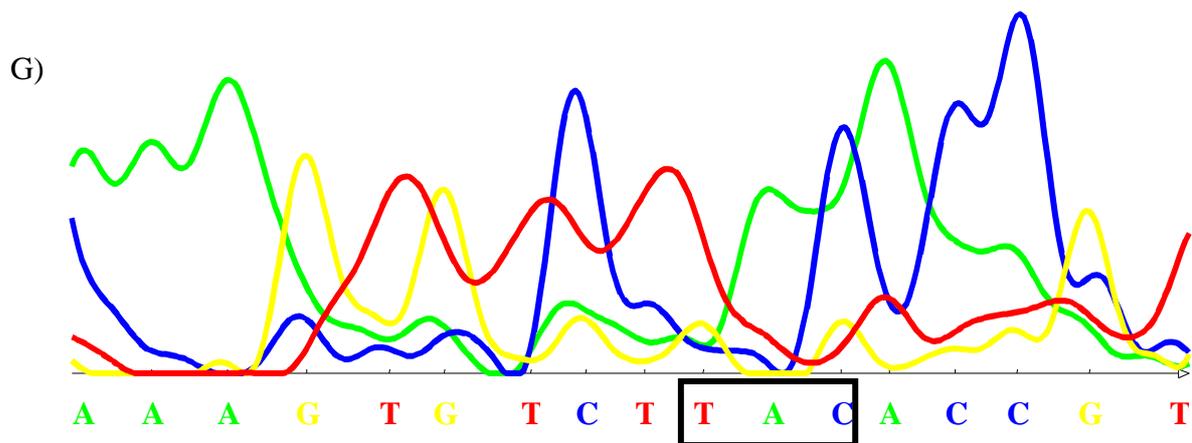


Figura 26. Análisis de secuenciación del ADN tras la amplificación por PCR
Asp:335:Tyr

- G) Codón 335. Un cambio de la base nitrogenada de Guanina a Timina y formación de una población mixta (gac+tac) provoca un cambio de aminoácido (Ácido Aspártico a Tirosina) en el codón 355.
- H) Codón 355 *wild type*



7. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es una patología de trascendencia sanitaria mundial. Aproximadamente 11 millones de personas en el mundo mueren de cáncer de pulmón cada año, y en un 80% de estos, es debido a cáncer de pulmón del tipo célula no pequeña o no microcítico (CPNM). Se estima que el 80-90% de los cánceres de pulmón son producidos por el tabaco; sin embargo, aunque se considera el humo del tabaco como el principal factor etiológico, sólo el 20% de los fumadores desarrollan cáncer de pulmón. Por tanto, otros factores de tipo ambiental y genético deben jugar un papel significativo en la susceptibilidad de padecer cáncer de pulmón.

Actualmente, más de la mitad de los casos se presentan al diagnóstico como un estadio diseminado o localmente avanzado, y los métodos actuales de cribaje para intentar frenar el tremendo impacto de esta enfermedad no han logrado una detección más precoz. Es indiscutible que faltan una serie de parámetros (marcadores genéticos, moleculares, biológicos...) que nos permitan identificar el riesgo de padecer cáncer en aquellos sujetos con factores de riesgo (fumadores, mayores de 45 años...), parámetros que nos ayuden a una detección en estadios más precoces, a determinar pacientes de alto riesgo de recaída, a valorar una respuesta al tratamiento y en definitiva, a mejorar el pronóstico actual de los pacientes afectados de cáncer de pulmón.

Este estudio se ha realizado únicamente con pacientes afectados de cáncer de pulmón localizado con estadio I-III A e intervenidos quirúrgicamente. El tratamiento del paciente afecto de CPNM en este estadio no está bien establecido y es objeto permanente de discusión. El tratamiento quirúrgico es el único capaz de curar en estos estadios, a pesar de lo cual hasta un 50% de los pacientes con estadio IB desarrollan en su seguimiento metástasis a distancia y mueren a causa de ello. En esta serie, un 40% de todos los pacientes han fallecido o presentado recidiva tumoral durante el seguimiento.

Debido a que los factores pronósticos de uso actual como el estado basal del paciente y la clasificación TNM son claramente insuficientes como factores predictivos en el CPNM, en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol y siguiendo la línea de trabajo de búsqueda de factores pronósticos en la patología tumoral de mayor incidencia, se ha realizado este estudio en CPNM con dos objetivos.

El primer objetivo de este trabajo era determinar la posibilidad de aislar el ADN tumoral en el suero de los pacientes con cáncer de pulmón localizado estadio I-IIIa intervenidos quirúrgicamente, y valorar el significado de este hallazgo. El segundo objetivo del estudio era comprobar si el gen de la α -tubulina puede detectarse en el ADN genómico de los pacientes intervenidos de CPNM y si así es, determinar si la tubulina puede ser un gen diana como marcador del cáncer de pulmón de célula no pequeña.

Incluso en el CPNM intervenido quirúrgicamente de manera radical, siempre existe la posibilidad de que haya quedado enfermedad residual en forma de células metastásicas circulantes. Varios grupos de investigación han demostrado la presencia de células tumorales en el torrente sanguíneo de pacientes con diversos tipos de cáncer, así que probablemente podemos considerar al cáncer de pulmón como una enfermedad sistémica o crónica desde su inicio. Todos los métodos actuales de diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón, se basan en imágenes radiológicas que incluyen radiología convencional, tomografía computerizada, resonancia magnética, gammagrafía ósea, ecografía y desde hace poco tiempo la tomografía por emisión de positrones (PET). Todas ellas son técnicas cuya interpretación está sometida a error, y además, el límite de detección del tumor es de aproximadamente 1 cm, lo que representa 10^9 células o una masa tumoral de 1 gramo. La presencia de micrometástasis no detectadas por estos métodos es posiblemente la causa de recaída en los pacientes intervenidos. En 1977 se publicó en una revista de gran prestigio oncológico (*Leon, 1977*) la primera demostración científica de la presencia de concentraciones de ADN anormalmente elevadas en el suero de pacientes afectados de cáncer. En este trabajo, el ADN tumoral se detectaba mediante un método indirecto de inmunoensayo en el suero de 153 pacientes afectados de distintas patologías tumorales (mama, pulmón, colorectal, genitourinario, cabeza y cuello, sistema nervioso central, linfomas y sarcomas) y como controles utilizaban el suero de 53 individuos sanos. Los resultados mostraban que las personas sanas tienen unos niveles de ADN circulante que oscilan entre los 0 y 100 ng/ml, considerados como normales, frente a la concentración en pacientes neoplásicos que varía entre 0 y 50 ng/ml en un 50% de los casos y entre 50 y 5.000 ng/ml en el 50% restante. Aunque no pudieron correlacionar los niveles de ADN con el tamaño o la localización del tumor, demostraron niveles significativamente más elevados en

aquellos pacientes con enfermedad metastásica. Además, pudieron correlacionar una disminución de los niveles séricos de ADN con una reducción tumoral y con una mejoría sintomática.

Numerosos estudios posteriores han demostrado que este ADN sérico aislado en sangre periférica, procede del tumor primario y que presenta las mismas alteraciones moleculares. *Peck et al* fueron capaces de aislar células tumorales circulantes en sangre periférica mediante la técnica RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*). Esta técnica es una variante del PCR que permite la amplificación de secuencias provenientes del ARN, y detectaron el ARN mensajero de la proteína epitelial *citokeratina 19*. Demostraron su presencia en pacientes afectados de cáncer de pulmón de diferentes tipos histológicos (40% en el subtipo de adenocarcinomas, 41% entre los escamosos y 27% en carcinoma de célula pequeña). Además la cuantificación de las células tumorales circulantes se correlacionó con la carga tumoral y con la respuesta al tratamiento.

En el presente estudio se ha cuantificado la concentración de ADN en la sangre de individuos sanos y en la de pacientes intervenidos de cáncer de pulmón en diferentes momentos de su evolución. Se ha encontrado ADN tumoral en el suero de todos los pacientes con una concentración media de ADN sérico de 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (con un recorrido entre 1.2 y 33 $\mu\text{g/ml}$). También se ha detectado ADN en los individuos sanos, con una concentración media de 3.6 $\mu\text{g/ml}$ (recorrido entre 0.4 y 7.6 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, la diferencia entre ambos grupos -pacientes e individuos sanos- fue estadísticamente significativa ($p= 0.0001$). Como se ha referido anteriormente, la presencia de ADN en el suero de los individuos controles no es de extrañar, pues se ha de tener en cuenta que nanogramos de ADN circulante en sangre se detectan en individuos sanos debido a ciertos procesos autoinmunes como son por ejemplo el lupus sistémico eritematoso, pancreatitis, artritis reumatoide, colelitiasis, colitis ulcerosa..., aunque en muy pequeña cantidad (del valor de 10^{-14} ng/ml de ADN soluble). En el caso de los pacientes, la cuestión de si el ADN circulante detectado, proviene realmente del tumor o proviene de la liberación de las células sanguíneas del huésped –por ejemplo, de la lisis celular producida por la misma extracción sanguínea con la aguja-, es muy discutida. Ya en 1989, *Stroun et al* comprobaron que la estabilidad de la doble cadena de ADN tumoral

es mucho más débil que la del ADN de células normales. Esta característica les permite detectar y cuantificar el ADN circulante, midiendo su absorbancia (hipercromacidad) a 260 nm y comprobar que el ADN detectado en suero / plasma de pacientes oncológicos proviene fundamentalmente del tumor. Más recientemente, *Jahr et al* desarrollan que el ADN del plasma proviene en su mayoría del tumor primario, aunque también en menor medida de células no tumorales, estas últimas, del tejido necrótico que rodea al tumor y que se degenera como consecuencia del crecimiento tumoral y, que es liberado al torrente sanguíneo. Refieren que ambos tipos de ADN provienen de dos procesos diferentes de muerte celular: apoptosis y necrosis celular. Además defienden que los fragmentos de ADN producidos por apoptosis son de tamaño más pequeño que los producidos por necrosis celular.

La mayoría de los métodos empleados en el laboratorio no son lo suficiente sensibles como para detectar la presencia de células circulantes en un gran número de pacientes con carcinomas en estadios precoces. Probablemente, puede que sea debido no sólo a la falta de sensibilidad del método utilizado sino también a que las células aparezcan periódicamente en la circulación durante el desarrollo del tumor. De hecho, el mecanismo por el cual se libera ADN tumoral al torrente sanguíneo, es desconocido. Una explicación razonable sería que la liberación intermitente de células tumorales al torrente sanguíneo se relacionase con el desarrollo de metástasis tumorales. No obstante, también se han detectado células tumorales en el torrente sanguíneo mediante PCR en un gran número de pacientes con buen pronóstico y que no desarrollan metástasis, es decir, su detección no implica el desarrollo de enfermedad a distancia. Incluso, por técnicas de inmunocitoquímica se han detectado células cancerígenas en la médula ósea en pacientes con enfermedad clínicamente localizada (*Braun et al*).

Si realmente se produce una liberación sanguínea de células tumorales como un acontecimiento precoz en la tumorigénesis o como un factor predictivo de mal pronóstico y determinante de aparición de metástasis, su detección podría utilizarse como método de cribaje y de seguimiento. Sin embargo, como ya se ha referido previamente, hasta el momento actual tan sólo dos parámetros han guiado las indicaciones de la quimioterapia o la agresividad de un cáncer de pulmón en un

individuo en concreto: estadio TNM y *performance status* o estado basal del paciente. Otros parámetros de carácter clínico como son la pérdida de peso, la presencia de niveles de hemoglobina $< 11\text{g/dl}$ en sangre periférica, el grado de diferenciación histológica o la edad al diagnóstico, tienen un valor discutido como factores predictivos. Por otra parte y en el ámbito de la biología molecular, los estudios realizados se han centrado en determinar si la presencia o ausencia de una alteración genética determinada puede predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón. Como ya se ha comentado en el capítulo de *Factores pronósticos*, las mutaciones en el oncogén *k-ras* son las que han demostrado esta relación con un peor pronóstico con mayor contundencia, tanto en estadios iniciales como avanzados. Asimismo, la sobreexpresión del gen *Her-2/neu* combinada con la presencia de mutaciones en *k-ras* también parece implicar un peor pronóstico (Rosell, 1996, 1997). Sin embargo, la presencia de mutaciones en *p53* es controvertida por lo que se refiere a un mejor o peor pronóstico (Sánchez-Céspedes, 1998). La dificultad de las técnicas y la discrepancia de los resultados de los diferentes estudios, motiva que ninguna de estas alteraciones genéticas se utilicen como factores predictivos en la práctica clínica diaria.

En este estudio, se ha intentado definir si el gen de la β -tubulina podría ser un factor pronóstico de supervivencia. Este gen fue estudiado por Monzó *et al* en pacientes con CPNM estadio IIIB y IV en los que se investigó la presencia de mutaciones somáticas en la β -tubulina y su relación con la resistencia al paclitaxel. Se buscaron mutaciones en el dominio de unión al agente quimioterapéutico (los 31 aminoácidos del extremo amino terminal, que corresponden a los exones 1 y 2) y en el dominio de unión al GTP (exón 4 principalmente). Todas las mutaciones se encontraron en el exón 4, en la zona de unión al GTP. Los pacientes con mutaciones en el gen de la β -tubulina presentaban resistencia al paclitaxel y tenían una media de supervivencia de tres meses, menor incluso que la que hubieran tenido sin quimioterapia con el taxano. La explicación que ellos refieren es que puede deberse a que la célula tumoral que está mutada ha empezado un proceso de apoptosis, y entonces al añadirle paclitaxel a estas células, los microtúbulos que no se hubieran polimerizado empiezan la polimerización y el proceso de mitosis y replicación celular. El paclitaxel es un agente polimerizador tan potente que suple al GTP en ausencia de éste y favorece la polimerización en las condiciones más

adversas, contribuyendo así a la proliferación tumoral. Por el contrario, los pacientes que carecían de mutaciones en el gen de la tubulina, tenían una media de supervivencia de 10 meses y un índice de supervivencia a uno, tres y cinco años del 33,3 %, 12.1 y 3 % respectivamente. Estos resultados reflejan un fuerte contraste con la falta de respuesta y pobre supervivencia de los pacientes con mutación del gen de la tubulina.

Basándonos en esta investigación y por las características propias de los microtúbulos que los hacen imprescindibles para la célula, se realizó este estudio de marcador predictivo centrándonos en el gen de la tubulina. Como se ha comentado en el capítulo de *Introducción*, los microtúbulos son unos elementos ubicuos formados por la asociación de monómeros de α y β -tubulina, esenciales para el transporte intracelular y división celular. Cada monómero de tubulina se une a un nucleótido de guanina (GTP), el cual es intercambiable en la subunidad β (*E-site*) pero no en la subunidad α (*N-site*). La unión del GTP a la subunidad β de la tubulina parece que tiene un papel únicamente estructural, sin embargo el GTP unido a la α -tubulina es crucial para la polimerización del microtúbulo. De acuerdo con *Nogales et al* y según su modelo por cristalografía electrónica, la posición del paclitaxel en la subunidad β está ocupada por 8 aminoácidos extras en la subunidad α , lo que sugiere que el paclitaxel puede simular el efecto estabilizador de los 8 residuos extras de la α -tubulina en el bucle o *loop M*.

En el presente estudio se escogió el isotipo M40 para la secuenciación de la β -tubulina porque se ha demostrado que es el isotipo de mayor expresión suponiendo más del 85% del total del ARN de la β -tubulina. La expresión de diferentes isotipos del gen de la tubulina se explica por la función específica de cada uno de estos isotipos. *Kavallaris et al* estudiaron la expresión de los diferentes isotipos en líneas celulares derivadas de pulmón y en células de cáncer de ovario epidérmico encontrando un aumento de la expresión de los isotipos HM40, H 4 y H 5. La expresión alterada de los diferentes isotipos parece que alteran las propiedades dinámicas de la tubulina o de los microtúbulos de tal forma que atenúan la acción del paclitaxel. Además se ha postulado que los diferentes isotipos de tubulina se unirían a diferentes proteínas MAP, aumentando así la variabilidad de los microtúbulos. De hecho, se ha comprobado *in vitro* que los microtúbulos compuestos por las tubulinas de clase III (H 4) y IV (H 5 y

H 2) son de 7.2 a 7.4 veces menos sensibles al paclitaxel que los microtúbulos formados por tubulina sin fraccionar.

Como se ha descrito en el apartado de *Métodos*, se diseñaron los cebadores o *primers* a partir de regiones intrónicas para evitar la presencia de pseudogenes y, se comparó la secuencia con 30 muestras de tejido sano o de suero de sujetos controles y con el banco del genoma *Genbank* para descartar la presencia de polimorfismos. Se observó un polimorfismo en el codón 11 (CAA-CAG; Gln:11:Gln) en el ADN sérico de los 52 pacientes de la serie. Este tipo de sustitución de nucleótido no provocó ningún cambio en el aminoácido ni en la secuencia de la proteína (Glutamina). El mismo tipo de polimorfismo se aisló en los tres tipos de muestra control: ADN del linfocito de 10 sujetos sanos, ADN sérico de 10 sujetos sanos, y ADN de las 10 muestras de tejido pulmonar sano. Parece que este cambio de nucleótido es específico del isotipo M40 (*Giannakokou*, comunicación personal).

Respecto al porcentaje de mutación del gen de la β -tubulina, en este estudio dicho gen estaba mutado en un 40% de los pacientes. Esta frecuencia de mutación es comparable con la del gen p53 en el cáncer de pulmón, un marcador importante de la inestabilidad genómica en el cáncer de pulmón, y es comparable también con otros muchos genes (k-ras...) estudiados.

Además, analizando la localización de las mutaciones de la β -tubulina, se ha encontrado que dichas mutaciones se sitúan en el exón 4 y se agrupan en dos regiones que hemos llamado *Región 1* (codones 102-264) y *Región 2* (codones 277-425). Las mutaciones en la región de los dominios de unión al GTP (*Región 1*) tienen una tendencia a afectar negativamente a la supervivencia, aunque no llega a una significación estadística ($p=0.5$). También se ha detectado que las mutaciones en la segunda parte de la proteína (*Región 2*) tienen una tendencia hacia una mejor supervivencia ($p=0.07$). Probablemente, debido al pequeño tamaño de la muestra, ninguno de los dos hallazgos ha sido estadísticamente significativo.

Por otra parte, al intentar correlacionar los hallazgos de la pieza tumoral quirúrgica de los 19 pacientes de los que se disponía tejido, con los hallados en el suero durante el seguimiento del paciente, en algunos casos la presencia de ADN tumoral en sangre se correspondía con la presencia de enfermedad clínica diseminada a pesar del tratamiento quimioterápico, y en otros no era así. Como ya se ha referido anteriormente, de este subgrupo tres pacientes han presentado una mutación en el codón 180 con un consiguiente cambio de aminoácido de Valina a Isoleucina (Val:180: Ile). El cambio de estos aminoácidos podría suponer un cambio en las interacciones hidropáticas y en la polaridad de la molécula. Esta misma mutación en el residuo 180 también se encontró en el tejido tumoral de 2 pacientes en el estudio de *Monzó et al*, lo que sugiere una importancia en dicha localización. En relación con el modelo molecular de la α -tubulina, la sustitución de Valina por Isoleucina (Val:180:Ile), motivó a hipotetizar que en el sitio de unión al GTP, dicha mutación confiere un cambio en el patrón normal de movimiento molecular de la tubulina debido a interacciones residuo-residuo y debido a un cambio en la estructura secundaria y conformación de la proteína. *González-Garay et al* han demostrado recientemente que hay un grupo de mutaciones que afectan a un grupo de Leucinas (Leu 215, Leu 217 y Leu 228) que provocan una resistencia al paclitaxel en las líneas celulares CHO, lo cual sugiere que este grupo de Leucina tiene una importancia estructural en el ensamblaje de los microtúbulos. En el presente estudio las tres mutaciones detectadas en el tejido pulmonar tumoral localizadas en el grupo Isoleucina (Val:180:Ile), podrían tener un significado pronóstico. Otros estudios (*Boggs, 1988*) han demostrado también que las deleciones o mutaciones puntuales localizadas en la segunda mitad de la proteína podrían afectar las características de unión a la proteína. Todos estos descubrimientos acerca de mutaciones puntuales nos ofrecen una idea de la gran importancia de la estructura primaria y secundaria de la tubulina.

En este trabajo se ha intentado correlacionar las mutaciones con el modelo estructural de la α -tubulina, analizando los contactos longitudinales entre α y β -tubulina. En la representación gráfica (Figura 27) el GTP intercambiable está próximo al sitio de unión del paclitaxel en lo alto del modelo estructural de la α -tubulina. Este modelo muestra que las mutaciones de la α -tubulina localizadas en el extremo carboxilo pueden aumentar la estabilidad de los contactos longitudinales α y β . Ambos, el paclitaxel y el

GTP intercambiable estabilizan los contactos longitudinales. Esto podría explicar la tendencia a una mejor supervivencia en el grupo de pacientes con mutaciones en la Región 2. Este paradójico efecto de una mutación genética afectando de manera favorable a la supervivencia no es algo desconocido. Por ejemplo, las pacientes afectas de un cáncer de mama que sobre-expresan el gen *HER2* (o *c-erbB-2*) responden mejor a altas dosis de quimioterapia, pero no se observan diferencias en aquellas que no lo expresan. En la misma línea, pacientes afectos de cáncer de colon que presentan inestabilidad de microsatélites tienen una mejor supervivencia, pero paradójicamente son resistentes al tratamiento quimioterápico de elección con 5-fluorouracilo.

Teniendo en cuenta todo lo comentado previamente y los resultados obtenidos, lo más importante a destacar de este trabajo es la posibilidad actual hoy en día, de obtener material y por tanto información genética de los pacientes a través de una simple extracción sanguínea. La información que ello nos proporciona puede ayudarnos en lo sucesivo a mejorar el pronóstico del paciente afecto de cáncer del pulmón y de otras tumoraciones.

Con las aportaciones de esta tesis doctoral y siguiendo esta línea de investigación, en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, se ha desarrollado el diseño de un nuevo protocolo de tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña llamado GILT de las siglas inglesas *Genotypic International Lung Trial*, basado en las alteraciones genéticas detectadas en el suero / plasma de los pacientes. Uno de los objetivos de este protocolo es valorar los cambios en la carga de ADN tumoral desde el diagnóstico hasta el final del tratamiento. El modelo de dicho diseño se muestra en la Figura 28. Se trata de un ensayo aleatorizado, donde los pacientes del brazo control reciben docetaxel y cisplatino como tratamiento quimioterápico. Los pacientes incluidos en la rama genotípica reciben el mismo régimen si no tienen anormalidades genéticas, pero si se detectan mutaciones del gen de la β -tubulina en el suero del paciente, se tratan con gemcitabina y cisplatino. Si los pacientes presentan sobreexpresión del gen *ERCC-1* recibirán gemcitabina y docetaxel y finalmente, si los pacientes presentan ambas situaciones, mutaciones del gen de la β -tubulina y sobreexpresión de *ERCC-1* recibirán una combinación de no-taxano/no-

cisplatino. Además se irá analizando el ADN sérico antes y después del tratamiento quimioterápico, y antes y después de la cirugía para determinar los posibles cambios genéticos a lo largo de la evolución del tumor. La determinación de estos marcadores de resistencia favorecería a una mejor elección del tratamiento a aplicar a cada paciente, o como mínimo, saber qué tipo terapia no sería la adecuada.

En la medida que seamos capaces de aprovechar nuestros conocimientos sobre la biología molecular y aplicar las nuevas técnicas de las que disponemos en la práctica clínica, seremos capaces de atravesar la barrera que nos separa de la investigación y de la quimioterapia farmacogenómica.

Figura 27. Las mutaciones de los residuos que se asocian a un peor pronóstico se localizan próximas a las regiones de unión al GTP y al paclitaxel. Las mutaciones de los residuos localizados cerca de la superficie de la β -tubulina, donde intervienen en los contactos laterales entre las subunidades adyacentes de β -tubulina, tienen una tendencia a un mejor pronóstico.

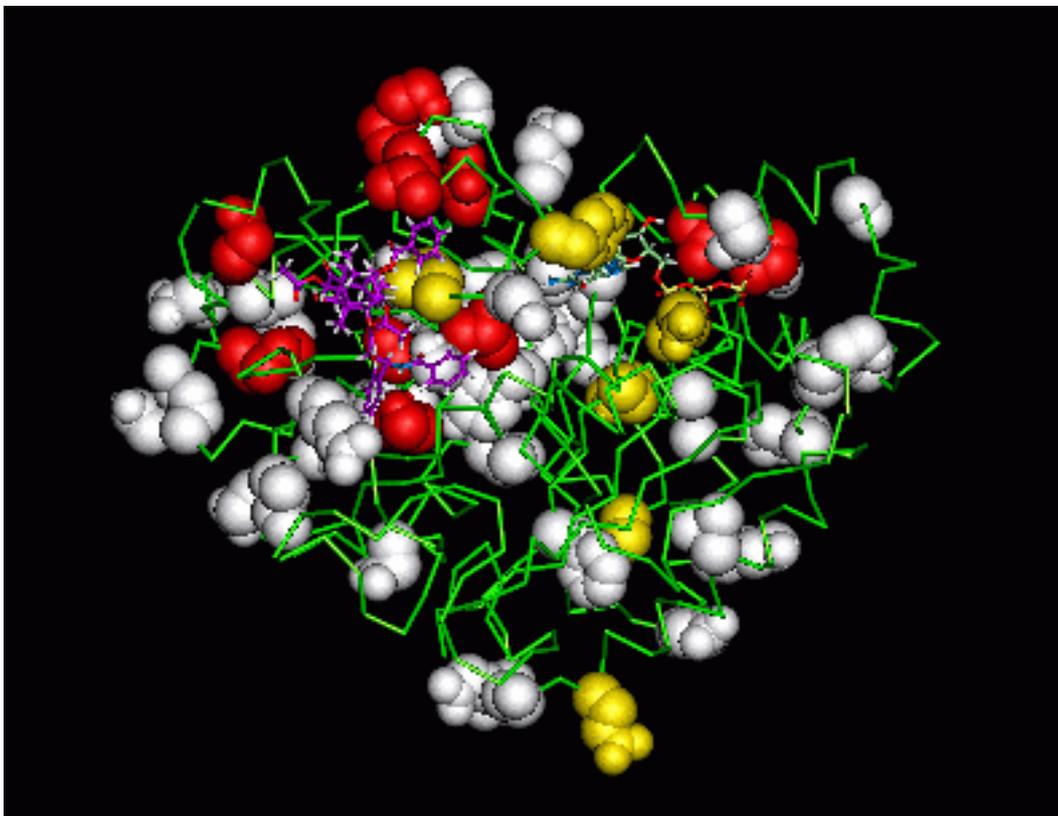
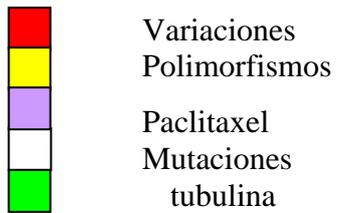
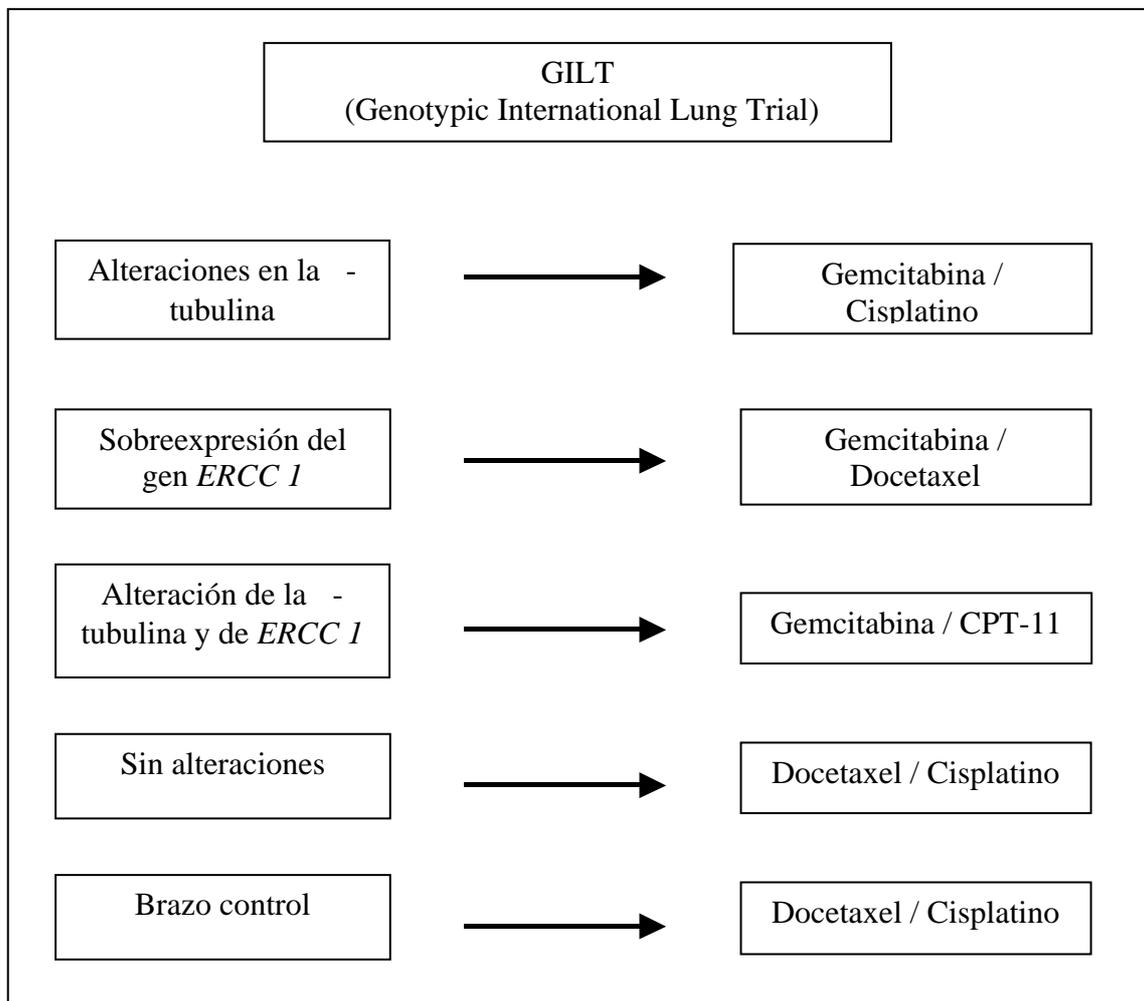


Figura 28. Ensayo genotípico en el cáncer de pulmón no microcítico



8. CONCLUSIONES

Como conclusiones que se desprenden de los resultados de este trabajo, en función de los objetivos planteados, se enumeran a continuación:

1. Es posible la detección y aislamiento de ADN en el suero de pacientes afectados de cáncer de pulmón estadio I-IIIa intervenidos quirúrgicamente.
2. La presencia de ADN sérico se detecta también en individuos sanos aunque en menor concentración.
3. La concentración de ADN en suero varía entre los sujetos sanos y aquellos intervenidos de un cáncer de pulmón estadio I-IIIa, y esta diferencia es estadísticamente significativa.
4. No se han encontrado diferencias significativas de la concentración de ADN sérico entre los distintos estadios I-IIIa de cáncer de pulmón.
5. No podemos considerar a los pacientes intervenidos de cáncer de pulmón de célula no pequeña estadio I-IIIa como pacientes de buen pronóstico sin riesgo de recaída tumoral. En nuestro estudio todos ellos presentaban niveles anómalos de ADN tumoral sérico, y un 40% de los mismos han fallecido debido a progresión o recidiva tumoral.
6. El gen de la β -tubulina se encuentra mutado en un alto porcentaje de los pacientes estudiados (40%) intervenidos de cáncer de pulmón de célula no pequeña estadio I-IIIa. Todas las mutaciones de dicho gen se localizan en el exón 4.
7. La presencia de mutación del gen de la β -tubulina no se ha detectado en ninguna de las poblaciones sanas utilizadas como procedimiento de control.

8. La presencia de la mutación del gen de la β -tubulina no se correlaciona con el estado basal del paciente, con el hábito tabáquico, con la histología ni con la clasificación tumoral TNM.
9. La presencia de mutación en la *Región 1* (codones 102-264) del gen de la β -tubulina, se asoció a un peor pronóstico, muy cercano a la significación estadística ($p= 0.5$).
10. La presencia de mutación en la *Región 2* (codones 277-425) del gen de la β -tubulina mostró una tendencia a una mejor supervivencia, pero no alcanzó una significación estadística ($p= 0.07$), probablemente debido al limitado tamaño de la muestra.
11. La importancia de la localización de la mutación en el gen de la β -tubulina radica en los cambios conformacionales de su estructura molecular tridimensional.
12. La presencia o ausencia de mutaciones del gen de la β -tubulina en el tejido tumoral primario, se correlacionó en ocasiones con la determinación de dicha mutación en la sangre periférica. En determinados pacientes dicha mutación desaparece en la sangre periférica, y en otros pacientes la mutación sérica permanece a pesar de la quimioterapia.
13. Son necesarios más estudios sobre el papel de la β -tubulina en el cáncer de pulmón, puesto que podría tener un papel como marcador de inestabilidad genómica al igual que la $p53$.

9. BIBLIOGRAFÍA

ADACHI J-L, Shiseki M, Okazaki T, et al. Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 1995; 14: 301.

ALBAIN KS, Rusch VW, Crowley JJ, et al: Concurrent cisplatin/etoposide plus chest radiotherapy followed by surgery for stages IIIA (N2) and IIIB non-small-cell lung cancer: Mature results of Southwest Oncology Group phase II study 8805. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1880-1892.

ANDRE F, Grunenwald D, Pignon JP, et al. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2981-2989.

ANKER P, Lefort J, Vasioukhin V, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112: 1114-1120.

ASHWORTH TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14: 146-147.

BEPLER G, Fong KM, Johnson BE, et al. Association of chromosome 11 locus D11S12 with histology, stage, and metastases in lung cancer. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 14-19.

BLOEDORN FG, Cowley RA, Cuccia CA, et al. Combined therapy with irradiation and surgery in the treatment of bronchogenic carcinoma. *Am J Roent Rad Ther Nucl Med* 1961; 85:875-885.

BOGGS BA, Minotti AM, Loeb LS, Cook R, Cabral F. Mutations affecting assembly of α -tubulin localize to a region near the carboxyl terminus. *J Biol Chem* 1988; 263: 14566-14573.

BRAUN S, Pantel K, Müller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 535-33.

BRUHN N, Beinert T, Oehm C et al. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 72-82.

CHANG AY, Kim K, Glick et al. Phase II study of taxol, merbarone, and piroxantrone in stage IV non-small-cell lung cancer: The Eastern Cooperative Oncology Group results. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 388-345.

CHEN XQ, Stroun M, Magnenat JL et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer. *Nature Medicine* 1996; 2: 1033-1034.

CHO JY, Kim JH, Lee YH, et al. Correlation between K-ras gene mutation and prognosis of patients with non-small-cell lung carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 462-467.

CHOI N, Carey RW, Daly W, et al. Potential impact on survival of improved tumor downstaging and resection rate by preoperative twice daily radiation and concurrent chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 712-722.

CHOI N, Baumann M, Flentjie M, et al. Predictive factors in radiotherapy for non-small-cell lung cancer: present status. *Lung Cancer* 2001; 31: 43-56.

COULET F, Blons H, Cabelguenne A et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 707-711.

DAUTZENBERG B, Chastang C, Arriagada R, et al. Adjuvant radiotherapy versus combined sequential chemotherapy followed by radiotherapy in the treatment of resected non-small cell lung cancer. *Cancer* 1995; 76: 779-786.

DAUTZENBERG B, Arriagada R, Chammard AB, et al. A controlled study of postoperative radiotherapy for patients with completely resected non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1999, 86: 265-273.

DESLAURIERS J, Brisson J, Cartier R, et al. Carcinoma of the lung: Evaluation of satellite nodules as a factor influencing prognosis after resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 97: 504.

DEVITA VT, Hellman S, Rosenberg SA, Eds. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. 5th Ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, 1997: 858-911.

DILLMAN RO, Seagren SL, Propert KJ, et al. A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1990; 323: 940-945.

DRESLER CM, Fratelli C, Babb J et al. Gender differences in genetic susceptibility for lung cancer. *Lung Cancer* 2000; 30: 153-160.

DYSZKIEWICZ W, Kasprzyk M, Piwkowski C, Gasiórowski L and Ramlau R. The prognostic value of DNA content analysis in patients with squamous cell lung cancer treated surgically. *Lung Cancer* 2000; 29: 161-167.

EBERHARDT W, Wilke H, Stamatis G et al. Preoperative chemotherapy followed by concurrent chemoradiation therapy based on hyperfractionated accelerated radiotherapy and definitive surgery in locally advanced non-small-cell lung cancer: mature results of a phase II trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 622-634.

EBERHARDT W, Stamatis G, Pöttgen C, et al. Induction chemotherapy and combined chemoradiotherapy including twice-daily radiation followed by surgery in small-cell-lung cancer with mediastinal involvement (stages IIB and IIIA). Five-year survival results of a small phase II trial. *Rev Oncología* 1999; 1: 154-159.

ELIAS AD, Skarin AT, Leong T, et al. Neoadjuvant therapy for surgically staged IIIAN2 non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 17: 147-161.

ESTELLER M, Sánchez-Céspedes M, Rosell R et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 67-70.

FELD R, Rubinstein L, Thomas Pa. Adjuvant chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 299-306.

FELIP E, Rosell R. Is the evidence in favour of neoadjuvant chemotherapy in stage IIIAN2 non-small-cell lung cancer solid enough? *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55: 4, 305-310.

FELIP E, Rosell R, Alberola, et al. Preoperative high-dose cisplatin versus moderate-dose cisplatin combined with ifosfamide and mitomycin in stage IIIA(N2) non-small-cell lung cancer: results of a randomized multicenter trial. *Clin Lung Cancer* 2000; 1: 287-293.

FERGUSON MK, Wang J, Hoffamn et al. Sex-associated differences in survival of patients undergoing resection for lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 245-249.

FERNÁNDEZ E, Borrás J, Levi F, Schiaffino A, García M, Vecchia C. Mortalidad por cáncer en España, 1955-94. *Med Clin* 2000; 114: 449-451.

FESKANICH D, Ziegler RG, Michaud DS, et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1812-1823.

FIGLIN RA, Piantodosi S. A phase 3 randomized trial of immediate combination chemotherapy versus delayed combination chemotherapy in patients with completely resected stage II and III non-small-cell lung carcinoma of the lung. *Chest* 1994; 106 (6 suppl): 310S-312S.

GARVER RI, Zorn GL, Wu X et al. Recurrence of bronchioloalveolar carcinoma in transplanted lungs. *N Engl J Med* 1999; 340: 1071-1074.

GIANNAKAKOU P, Sackett DL, Kang Y-K, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant β -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 1997; 272: 17118-17125.

GONZALEZ-GARAY ML, Chang L, Blade K, Menick DR, Cabral F. A β -tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance. *J Biol Chem* 1999, 274: 23875-23882.

GRAZIANO SL, Kern JA, Herndon JE, et al. Analysis of neuroendocrine markers, HER2 and CEA before and after chemotherapy in patients with stage IIIA non-small-

cell lung cancer: a Cancer and Leukaemia Group B study. *Lung Cancer* 1998; 21: 203-211.

GRAZIANO SL, Gamble GP, Newman NB, et al. Prognostic significance of *k-ras* codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 668-675.

GRYFE R, Kim H, Hsieh ETK, et al. Tumour microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.

HANAHAN D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70.

HIYAMA K, Ishioka S, Shirotani Y, et al. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and rb. *Oncogene* 1995; 10: 937-944).

HOFFMAN P, Mauer A, E Vokes. Lung Cancer. *Lancet* 2000, vol 355: 479-85.

HOLMES EC, Gail M. Surgical adjuvant therapy for stage II and stage III adenocarcinoma and large-cell undifferentiated carcinoma. *J Clin Oncol* 1986; 4: 710-715.

HUISMAN C, Smit EF, Giaccone G and Postmus PE. Second-line chemotherapy in relapsing or refractory non-small-cell lung cancer: a review. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3722-3730.

JAHR S, Hentze H, Englisch S et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665.

JASSEM J, Skokowski J, Dziadziuszko R, et al. results of surgical treatment of non-small-cell lung cancer: validation of the new postoperative pathologic TNM classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 19: 1141-1146.

KAVALLARIS M, Burkhart CA and Horwitz SB. Antisense oligonucleotides to class III β -tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* 1999; 80 (7): 1020-1025.

KELLER SM, Adak S, Wagner H, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2000; 343: 1217-22.

KEOHAVONG P, DeMichele MAA, Melacrinis AC, et al. Detection of *K-ras* mutations in lung carcinomas: Relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 411-418.

KERN JA, Schwartz DA, Nordberg JE, et al. p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990, 50: 518.

KERN JA, Slebos RJC, Top B, et al. C-erb-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 1994; 93: 516-520.

KHURI FR, Lotan R, Kemp BL et al. Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2798-2804.

KOK K Osinga J, Carritt B, et al. Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all types of lung cancer. *Nature* 1987, 330: 578.

KOPRESKI M, Benko F, Borys D, Khan A, McGarrity T, Gocke C. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 918-923.

KREUZER M, Boffetta P, Whitley E, et al. Gender differences in lung cancer risk by smoking: a multicentre case-control study in Germany and Italy. *Br J Cancer* 2000; 82: 227-233.

KUBUSCHOK B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 19-24.

KWIATKOWSKI DJ, Harpole DH Jr, Godleski J, et al. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: Clinical implications. *J Clin Oncol* 1988; 16: 2468-2477.

LAD T, Rubinstein L, Sadeghi A. The benefit of adjuvant treatment for resected locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 9-17.

LEVI F, Lccchini F, La Vecchia C, Negri E. Trends in mortality from cancer in the European Union, 1955-94. *Lancet* 1999, vol 354: 742-743.

LEON SA, Shapiro D, Sklaroff DM, and Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.

LUKEIS R, Irving L, Garson M, et al. Cytogenetics of non-small-cell lung cancer: analysis of consistent non-random abnormalities. *Genes Chrom Cancer* 1990, 2:116.

LUNG CANCER STUDY GROUP. Effects of postoperative mediastinal radiation on completely resected stage II and stage III epidermoid cancer of the lung. *N Engl J Med* 1986; 315: 1377-81.

LUNG CANCER STUDY GROUP. The benefit of adjuvant treatment for resected locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 9-17.

MAO L, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V et al. Phenotype and Genotype of advanced premalignant head and neck lesions after chemopreventive therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1545-1551.

MARTINI N, Kris MG, Gralla RJ, et al. The effects of preoperative chemotherapy on the resectability of non-small-cell lung carcinoma with mediastinal lymph node metastases (N2M0). *Ann Thorac Surg* 1988; 45: 370-379.

MATTSON K, Holsti LR, Holsti P, et al. Inoperable non-small-cell lung cancer: radiation with or without chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 477-82.

MEHDI SA, Tatum AH, Newman NB, et al. Prognostic markers in resected stage I and II non-small-cell lung cancer: an analysis of 260 patients with 5-year follow-up. *Clin Lung Cancer* 1999; 1: 59-67.

METZGER R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; 16: 309-316.

MIOZZO M, Sozzi G, Musso K, et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996, 56: 2285.

MITSUDOMI T, Steinberg SM, Oie HK, et al. Ras gene mutations in non-small-cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res* 1991; 51: 4999-5002.

MITSUDOMI T, Hamajima N, Ogawa M and Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000; (6): 4055-4063.

MONZÓ M, Rosell R, Sanchez JJ et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1786-1793.

MORENO V, Sánchez V, Galcerán J, Borrás JM, Borrás J, Bosch FX. Riesgo de enfermar y morir por cáncer en Cataluña- *Med Clin* 1998; 110: 86-93.

MOSCA P, Morse M, D'Amico T, Crawford J. Gene Therapy for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2000; 1, 218-226.

MOUNTAIN C. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997; 111: 1710-1717.

MUSS HB, Thor AD, Berry DA, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-1266.

NAWROZ H, Koch W, Anker P, Stroun M and Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 1035-1037.

NELSON HH, Christiani D, Mark E, Wiencke J, Wain J, Kelsey K. Implications and prognostic value of k-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 2032-8.

NEMUNAITIS J, Klemow S, Tong A, et al. Prognostic value of specific K-ras mutations, ras oncoprotein, and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenocarcinoma of the lung. *Am J Clin Oncol* 1998; 21: 155-160.

NOGALES E, Wolf SG and Downing KH. Structure of the tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 1998; 391: 199-203.

NOGALES E, Downing KH, Amos LA, Löwe J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTP ases. *Nature Struct Bio* 1998; 5: 451-458.

NOGALES E, Whittaker M, Milligan RA and Downing K. High-resolution of the model of the microtubule. *Cell* 1999; 90: 79-88.

NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. *BMJ* 1995; 311: 899-909.

PAESMANS M, Berghmans T, Vallot F, et al. Treatment with or without chemotherapy for locally advanced non small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review by the European Lung Cancer Working Party [abstract]. *Proc of ASCO* 1999; 90.

PANTEL K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996; 347: 649-653.

PARK JH, Shim YM, Baek HJ, et al. Postoperative adjuvant therapy for stage II non-small-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1821-1826.

PASS HI, Pogrebniak HW, Steinberg SM et al. Randomized trial of neoadjuvant therapy for lung cancer: interim analysis. *Ann Thorac Surg* 1992; 53: 992-998.

PATZ EF, Goodman PC, Bepler G. Screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2000; 343: 1627-1633.

PECK K, Sher YPS, Shih JY, Roffler SR, Wu CW, Yang PC. Detection and quantification of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58: 2761-2765.

PEZZELLA F Turley H, Kuzu I, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-694.

PIETERMAN RM, Van Putten JW, Meuzelaar JJ, et al. Preoperative staging of non-small-cell lung cancer with positron-emission tomography. *N Engl J Med* 2000; 343: 254-61.

PISTERS KMW, Ginsberg RJ, Putnam JB, et al. Induction paclitaxel and carboplatin (PC) in early stage non-small-cell lung cancer (NSCLC): early results of a completed phase II trial [abstract]. *Proc of ASCO* 1999; 1800.

PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257-63.

PRITCHARD RS, Anthony SP. Chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone in the treatment of locally advanced, unresectable, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 452-458.

RACILA E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4589-4594.

ROSELL R, Gómez-Codina J, Camps C, et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1994; 330:153-158.

ROSELL R, Font A, Pifarré A, et al. The role of induction (neoadjuvant) chemotherapy in stage IIIA NSCLC. *Chest* 1996; 109: 102S-106S.

ROSELL R, López-Cabrerizo MP, Astudillo J. Preoperative chemotherapy for stage IIIA non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 9: 149-155.

ROSELL R, Monzó M, Pifarré A, et al. Molecular staging of non-small-cell lung cancer according to K-ras genotypes. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 411-418.

ROSELL R, Pifarré A, Monzó M, et al. Reduced survival in patients with stage I non-small-cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *Int. J. Cancer* 1997; 74: 330-334.

ROSELL R, Gómez-Codina J, Camps C, et al. Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomised controlled trial. *Lung Cancer* 1999; 47: 7-14.

ROSELL R, Felip E. Role of multimodality treatment for lung cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 143-151.

ROSELL R, O'Brate A, Monzó M, et al. Pharmacogenomic research and serum DNA analysis in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Rev Oncología* 2001; 13: 101-109.

ROSELL R, Tarón M, O'Brate A. Predictive molecular markers in non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 101-109.

ROTH JA, Fosella F, Komaki R, et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 673-680.

ROTH JA, Nguyen D, Lawrence DD, et al: Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996; 2: 985-991.

ROTH JA, Atkinson EN, Fossella, et al. Long-term follow-up of patients enrolled in a randomised trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 1998; 21: 1-6.

ROSZKOWSKI K, Pluzanska A, Krzakowski M et al. A multicenter, randomized, phase III study of docetaxel plus best supportive care versus best supportive care in chemotherapy-naive patients with metastatic or non-resectable localized non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2000; 27: 145-157.

SALGIA R and Skarin A. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1207-1217.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES M, López MP, Moreno I et al. Importancia de la pérdida de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21) en cáncer de pulmón no microcítico. *Med Clin (Barc)* 1997; 109: 1-5.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES M, Monzó M, Rosell et al. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Annals of Oncology* 1998; 9: 113-116.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES M, Ahrendt SA, Piantadosi et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 2001; 61: 1309-1313.

SAUNDERS MI, Dische S, Barrett A. CHART: the implications of early results of the randomized controlled trials. [Abstract]. *Eur J Cancer* 1995; 31^a (suppl 5): S69.

SCHILLER JH, Adak S, Feins RH et al. Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a laboratory ancillary study on an Eastern Co-operative Oncology Group prospective randomized trial of postoperative adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001, 19: 448-457.

SCULIER JP, Paesmans M, Lafitte JJ, et al. Prognostic factors analysis for response to chemotherapy and survival in a prospective cohort of patients with unresectable locoregional non-small-cell lung cancer initially treated by induction chemotherapy. *Rev Oncología* 1999; 1: 92-100.

SHIELDS TW, Higgins GA Fr, Lawton R, et al. Preoperative x-ray therapy as an adjuvant in the treatment of bronchogenic carcinoma. *J Thor Cardiovasc Surg* 1970; 59: 49-61.

SHEPHERD FA, Dancey J, Ramlau R, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2095-2103.

SIEGFRIED JM, Gillespie AT, Mera R, et al. Prognostic value of specific K-ras mutations in lung adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 841-847.

SILINI EM, Bosi F, Pellegata NS, et al. *K-ras* gene mutations: An unfavorable prognostic marker in stage I lung adenocarcinoma. *Virchows Arch* 1994; 367-372.

SILVA JM, Dominguez G, García JM et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinico-pathological correlations. *Cancer Res* 1999; 59: 3251-3256.

SILVA JM, González R, Dominguez G, García JM, España P y Bonilla F. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes, Chrom and cancer* 1999; 24: 160-161.

SLEVOS RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. *K-ras* oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323: 561-565.

SMITH BM, Slade MJ, English J, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1432-1439.

SOZZI G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small-cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2689-2692.

STAMATIS G, Eberhardt W, Stüben G, et al. Preoperative chemoradiotherapy and surgery for selected non-small-cell lung cancer IIIB subgroups: long-term results. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1144-9.

STROUN M, Anker P, Maurice P et al. Neoplastic Characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46: 318-322.

SUGIO K, Ishida T, Yokoyama H, et al. Ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res* 1992; 52: 2903-2906.

TANG X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK, Mao L. Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1511-1516.

TAKAGI Y, Osada H, Kuroishi T et al. p53 mutations in non-small-cell lung cancers occurring in individuals without a past history of active smoking. *British J Cancer* 1998; 77 (10): 1568-1572.

THIBERVILLE L, Payne P, Vielkinds J et al. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res* 1995; 55: 5133-5139.

THOMAS M, Rube C, Semik M et al. Impact of preoperative bimodality induction including twice-daily radiation on tumor regression and survival in stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1185-1193.

VAN TRAPPEN PO, Gyselman VG, Lowe DG, et al. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* 2001; 357: 15-20.

VANSTEENKISTE J, Stroobants S, De Leyn P, et al. Lymph node staging in non-small-cell lung cancer with FDG-PET scan: a prospective study on 690 lymph node stations from 68 patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2142-2149.

VANSTEENKISTE J, Stroobants S, Dupont P, et al. Prognostic importance of the standardised uptake value on 18F-fluoro-2-deoxy-glucose-positron emission tomography scan in non-small-cell lung cancer: an analysis of 125 cases. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3201-3206.

VAN ZANDWIJK N, Smit EF, Kramer GWP, et al. Gemcitabine and cisplatin as induction regimen for patients with biopsy proven stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer: a phase II study of the European Organization for Research and treatment of Cancer Lung cancer Cooperative Group (EORTC 08955). *J Clin Oncol* 2000; 18: 2658-2664.

VESELLE H, Schmidt R, Pugsley J, et al. Lung cancer proliferation correlates with [F-18] fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3837-3844.

WARRAM J. Preoperative irradiation of cancer of the lung: final report of a therapeutic trial. A collaborative study. *Cancer* 1975, 36: 914-925.

WINTER S, Minna J, Johnson B, et al. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res* 1992, 52:4168.

YU D, Wang SS, Dulski KM, et al. C-erbB2/neu overexpression enhance metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis associated properties. *Cancer Res* 1994, 54: 3260.

ZANDWIJK NV, Smit EF, Kramer GWP, et al. Gemcitabine and cisplatin as induction regimen for patients with biopsy-proven stage IIIAN2 non-small-cell lung cancer: a phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Co-operative Group (EORTC 08955). *J Clin Oncol* 2000; 18: 1658-2664.

ZIEMMERMANN PV, Bint MH, Hawson GAT, et al. Ploidy as a prognostic importance of pre-treatment clinical characteristics in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1604.

ZHOU X, Kemp BL, Khuri FR et al. Prognostic implication of microsatellite alteration profiles in early-stage non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 559-565.