



Importancia clínica de los micrnas de la vía de p53 en cáncer de pulmón no microcítico: miR-34a y miR-16

Elena Gallardo Martín

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS
MICRORNAS DE LA VÍA DE P53 EN
CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO: miR-34a y miR-16.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elena Gallardo Martín

TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
ABRIL 2011

Memoria presentada por la licenciada en medicina Elena Gallardo Martín, para optar al grado de doctora.

Esta tesis doctoral, se ha realizado en la Universidad Barcelona, en el programa de Medicina, bajo la dirección del Dr. Alfons Navarro y la Dra. Nuria Viñolas.



A mis padres,

A Ber,

A mis hermanos,

La luz que alumbra mi camino

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no sería posible sin un montón de personas, que han estado detrás. No quiero dejar de mencionarlos y expresarles mi profundo agradecimiento:

- A los doctores Nuria Viñolas y a Mariano Monzó, os agradezco haber sido los guías en el principio de este proyecto, darme la posibilidad de seguir en él, a pesar de la distancia y por toda vuestra ayuda y apoyo.
- Al doctor Alfons Navarro. Es muy difícil expresar en palabras todo mi agradecimiento. No sólo eres el director. Gracias por explicarme y enseñarme como es el laboratorio y como se trabaja en él. Gracias por contagiarme tu entusiasmo por el trabajo. Sin ti, no hubiera sido posible.
- A Tania Díaz, gracias porque siempre me has echado una mano, en todo, hasta con lo más pesado, como son los papeleos. A Sonia Jansa, que me explicaste y ayudaste con la extracción de RNA y conseguiste que fuera un tiempo muy divertido.
- A todos los que han participado en los trabajos: los servicios de Oncología médica, Anatomía patológica, Neumología, Cirugía torácica del Hospital Clínic, el departamento de Embriología y Anatomía Humana de la Universidad de Barcelona y al laboratorio de Farmacogenómica de la Universidad de Navarra.
- A los servicios de Oncología médica y de Farmacia oncológica de Santiago de Compostela, que me habéis entendido y apoyado. Aprendo cada día de vosotros.
- Al doctor Rafael López, por tus ideas para esta tesis y por darme la oportunidad de seguir desarrollándome como profesional.
- A las doctoras María Jesús Lamas y Laura Escalera, porque me habéis ayudado a inspirarme.
- A Fernando de la Llave, que lleva la sangre artística de la familia, por la portada.
- A mis padres, a Ber, a mis hermanos y a mis amigos, porque siempre me apoyáis y me animáis.

Gracias a todos por todo. Este es un capítulo que se cierra para poder abrir otros nuevos.

INDICE DE CONTENIDOS

TABLA DE ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	15
1.1 CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN O DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS.	15
1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA.....	15
1.1.2. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA	26
1.1.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y PATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	29
1.1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA. DIAGNÓSTICO. ESTADIAJE Y PRONÓSTICO	41
1.1.5 FACTORES PRONÓSTICOS.....	64
1.2 TP53.....	71
MUTACIONES DE P53	74
1.3 MICRORNAs.....	77
GENERALIDADES.....	77
RNA interferencia.....	81
BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs	82
ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LOS miRNAs.....	86
MICRORNAs COMO ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES	87
TS-miRs.....	90
ONCOmiRs.....	90
PRINCIPALES MICRORNAs EN CÁNCER DE PULMÓN	92
MICRORNAs y P53	94
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	98
HIPOTESIS.....	98
OBJETIVOS.....	99
TRABAJOS	100
TRABAJO 1	100
RESUMEN	100
TRABAJO 2	110
RESUMEN	110
DISCUSIÓN.....	118
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA.....	126
ANEXOS	146

MATERIAL SUPLEMENTARIO TRABAJO 1	148
Figura suplementaria 1.....	148
MATERIAL SUPLEMENTARIO TRABAJO 2	149
Figura suplementaria 1.....	149
Figura suplementaria 2.....	150
Figura suplementaria 3.....	151

TABLA DE ABREVIATURAS

A: Adenosina

ADK: Adenocarcinoma

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

BCL2: *B-cell leukemia/lymphoma 2*

BIC: *B-cell integration cluster*

C: Citosina

Ca: Carcinoma

CDK: Cinasa dependiente de ciclina

CK: Citoqueratina

crasiRNA: Centrosome-associated RNAs

CCR: Cáncer colorrectal

CM: Cáncer de mama

CPNCP: Cáncer de pulmón no célula pequeña

CPCP: Cáncer de pulmón célula pequeña

CP: Cáncer de pulmón

CpG: Islas de citosina y guanina

CYP: citocromo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: RNA de doble cadena

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EE: Enfermedad extensa

EL: Enfermedad limitada

ELCWP: *European Lung Cancer Working Party*

EGFR: Receptor del factor epidérmico de crecimiento

EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

EPIC: *European Prospective Investigation into cancer*

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERBB: Familia de proteínas de EGFR.

ERCC1: *Excision Repair Cross Complementation 1*

FHIT: *Fragile histidine Triad*

G: Guanina

GBM: Glioblastoma

GSTM : Glutación S-transferasa mu 1

HPV: Virus del papiloma humano

IASCL: *International association for the study of the lung*

IALT: *The International Adjuvant Lung Cancer Trial*

IK: Índice de Karnofsky

KRAS: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog*

LLC: Leucemia linfática crónica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LOH: *Loss of heterocigosity*

LncRNA: *Long non-coding RNA*

M: Metástasis

m7G cap: 7-metil guanosina caperuza

MAPK: *Mitogen activated kinase-like protein*

MET: *met proto-oncogene*

miRNA: microRNA

miRISC: RISC con una cadena guía de un miRNA

MCL1: *Myeloid cell leukemia sequence 1*

MDM2: *Murine double minute oncogene*

moRNA: *miRNA-offset RNA*

MYC: *myelocytomatosis oncogene*

MSY-RNA: *MSY2-associated RNA*

N: *Nodes* (ganglios)

ncRNA: RNA no codificante

OG: Oncogén

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

PACT: Proteína de unión a dsRNA

PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PARs: *Promoter-associated RNA*

Pb: Pares de bases

pb: *p-bodies*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDCD4: *programmed cell death 4*

piRNA: PIWI-interacting RNA

PS: Performance status

pri-miRNA: miRNA primario

pre-miRNA: miRNA precursor

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

Rb: Retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: RNA interferencia

RISC: RNA-induced silencing complex; Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RMN: Resonancia magnetica nuclear

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa mediante retro-transcriptasa

RRM1: *Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit*

sdRNA: *Sno-derived RNA*

siRISC: RISC con una cadena guía de un siRNA

SIRT1: Sirtuin 1

snoRNA: small-nucleolar RNA

Sd: Síndrome

siRNA: *small-interfering RNA*

SLE (DFS): Supervivencia libre de enfermedad (*Disease free survival*)

SNC: Sistema nervioso central

SWOG: *Southwest Oncology group*

SVCS: Síndrome de vena cava superior

SG (OS): Supervivencia global (*Overall survival*)

T: Timidina

T: Tumor

TAC: Tomografía axial computerizada

tel-sRNA: *Telomere small RNA*

TPM1: Tropomiosina 1

TRBP: *TAR RNA-binding protein*

TS: *Tumor suppressor*

U: Uracilo

VEGF: *Vascular Endothelial Grothw Factor*

xiRNA: *X-inactivation RNA*

XPB: Xeroderma pigmentosum D

XRCC1: *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*

WIP1: *Wild type p53 induced phosphatasa 1*

WNT3A: *Wingless-related MMTV integration site 3A*

INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN O DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS.

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón es uno de los tumores más frecuentes en todo el mundo. Se detectan alrededor de 1.400.000 nuevos casos cada año – representa el 16,6% de todos los tumores en varones (965.000 casos) y el 7,6% en mujeres (387.000 casos) -. Se registran 1.200.000 muertes cada año a causa de esta enfermedad, siendo la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial¹.

En el año 2003, en Estados Unidos 171.900 americanos se diagnosticaron de cáncer de pulmón, de los que fallecieron 157.200. Con 187.000 muertes anuales, el cáncer de pulmón es la tercera causa de muerte por cáncer en Europa²

En China, la mortalidad por cáncer de pulmón en hombres es de 33 por cada 100.000 habitantes, con una expectativa de incremento en los próximos años^{3,4}.

En el año 2005, fallecieron en España 19.115 personas por cáncer de pulmón: 16.645 varones y 2.470 mujeres⁵. En las últimas décadas, la mortalidad por cáncer de pulmón en España ha cambiado. Mientras que la tasa de mortalidad en hombres, en 1973 era de 31 por cada 100.000 habitantes, en 1997 era de 58 por cada 100.000 habitantes, con un incremento anual del 2,7%. El incremento en la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón en hombres, en las cohortes nacidas hasta 1952, se justifica como consecuencia del incremento del hábito tabáquico en las generaciones siguientes. Es cierto, que se observa en las generaciones más jóvenes una tendencia a la disminución de la tasa de mortalidad, lo que sugiere una evolución más favorable, probablemente relacionada con la disminución del número de hombres fumadores. Para las mujeres, las tasas de mortalidad son 5-9 veces más bajas que para los hombres. Con una tasa de mortalidad de 6,3 por cada 100.000 habitantes en 1973 y del 6,4 por cada 100.000 habitantes en 1997. Sin embargo, el incremento de la mortalidad en las generaciones

más jóvenes, desde 1942, refleja el aumento de la prevalencia de fumadoras en la últimas décadas⁶.

Dada la pobre supervivencia del cáncer de pulmón, existe una gran correlación entre la incidencia y la mortalidad. La supervivencia global a los cinco años es de un 10-13% y esta no ha cambiado en las últimas dos décadas. A pesar de la implementación de terapias multidisciplinarias en el tratamiento de la enfermedad avanzada, existe una mejoría modesta de la supervivencia de los pacientes en estadios⁷.

MAPAS DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD POR CÁNCER DE PULMÓN MUNDIAL EN 2008, POR GÉNEROS

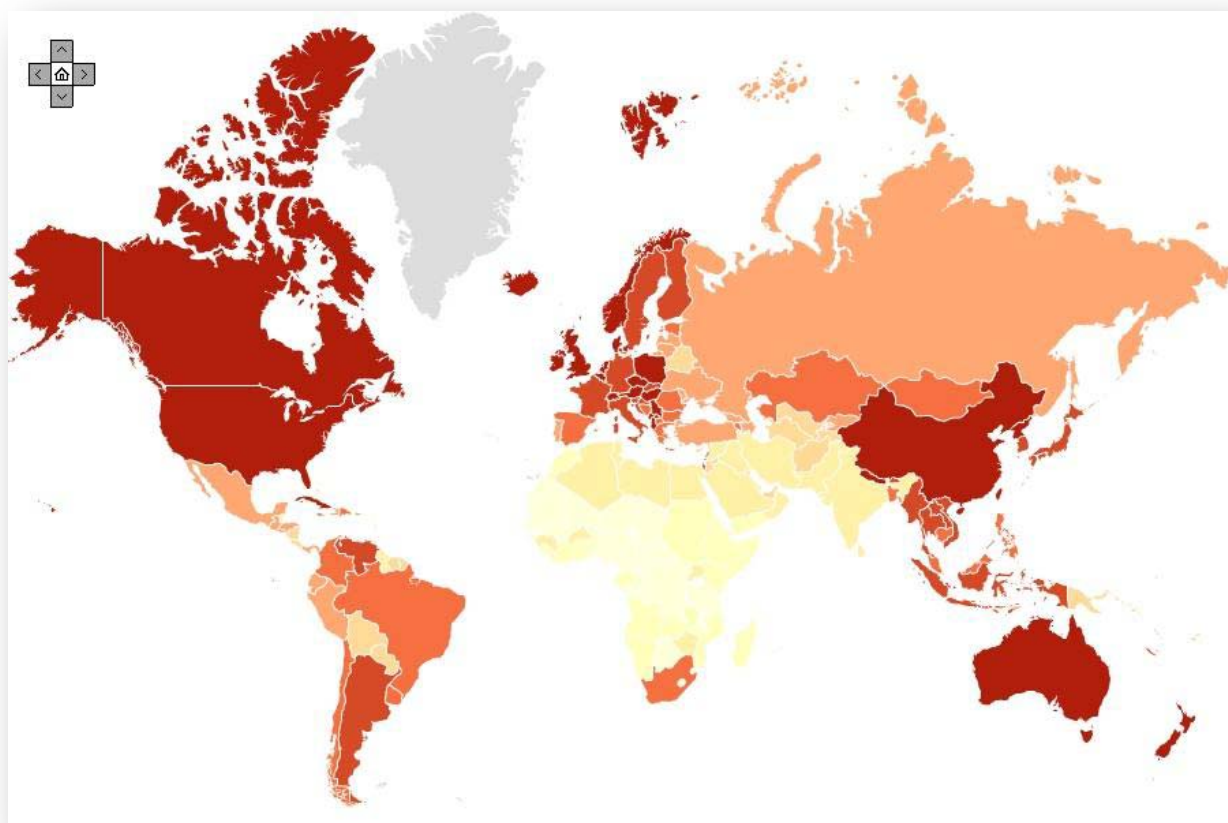


Figura 1: INCIDENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN EN MUJERES EN 2008. GLOBOCAN 2008 (IARC), (31/1/2011).



0 1.0 3.6 7.4 16.4 37

Tasa de incidencia estandarizada por edad y por 100.000 habitantes.

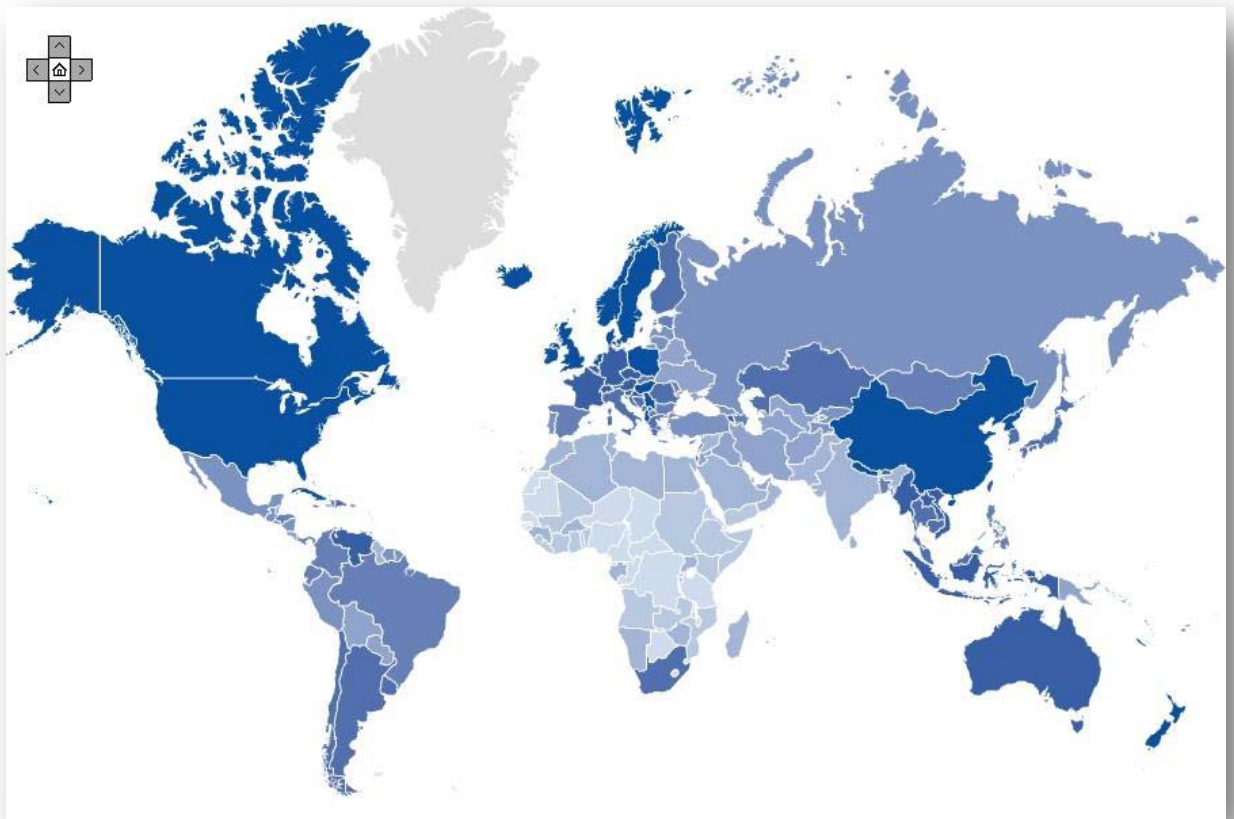


Figura 2: MORTALIDAD POR CÁNCER DE PULMÓN EN MUJERES EN 2008.
 GLOBOCAN 2008 (IARC), (31/1/2011).



0 0.9 3.3 5.7 9.4 30

Tasa de mortalidad estandarizada por edad y por 100.000 habitantes.

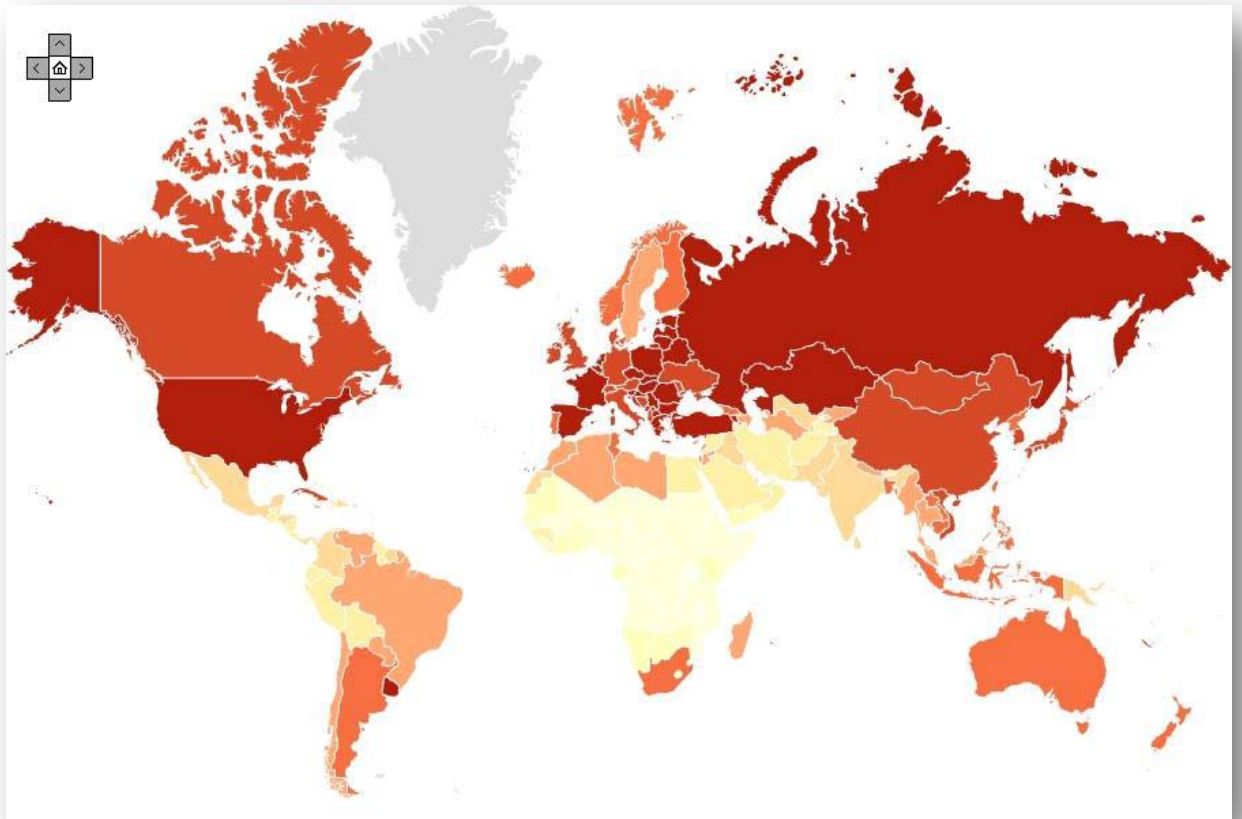


Figura 3: INCIDENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN EN HOMBRES EN 2008.
GLOBOCAN 2008 (IARC), (31/1/2011).



0 3.3 10.4 26.8 46.8 81

Tasa de incidencia estandarizada por edad y por 100.000 habitantes.

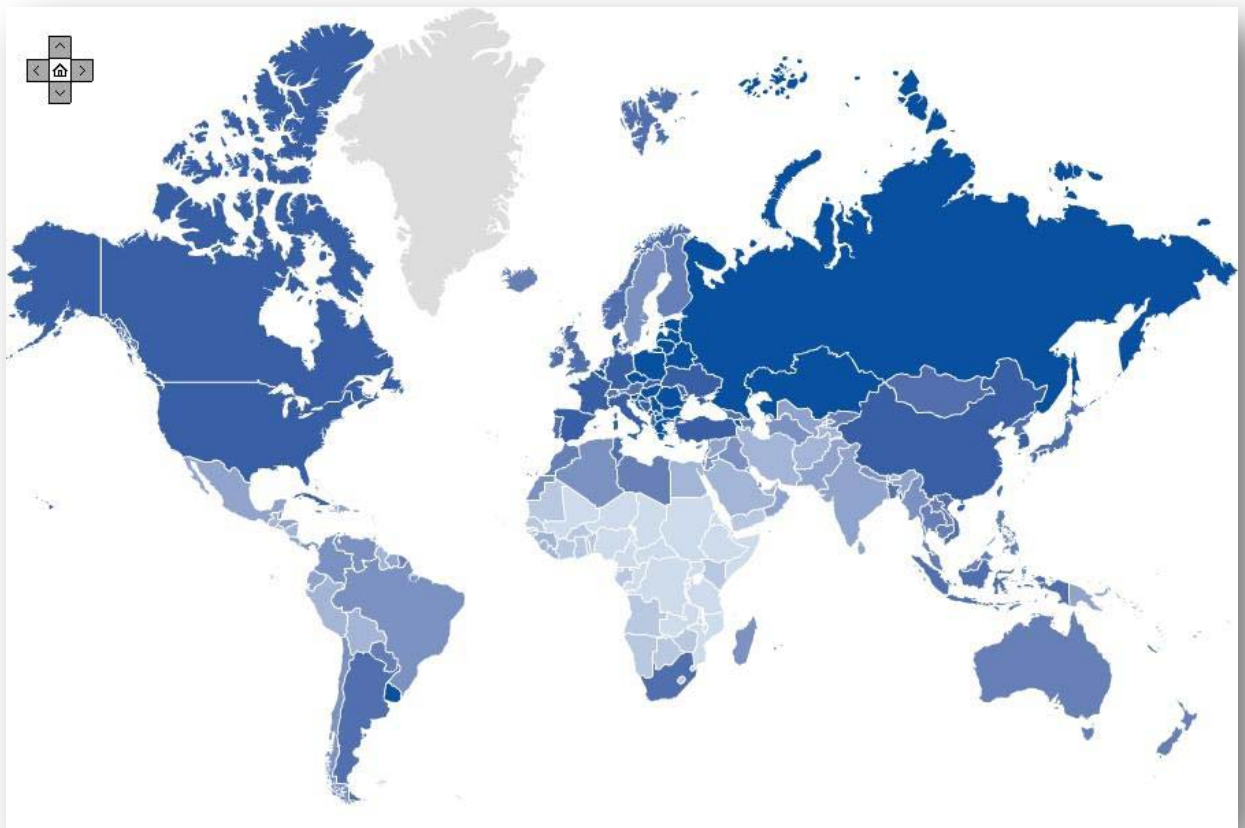


Figura 4: MORTALIDAD POR CÁNCER DE PULMÓN EN HOMBRES EN 2008. GLOBOCAN 2008 (IARC), (31/1/2011).



0 3.1 9.1 20.9 33.5 74

Tasa de mortalidad estandarizada por edad y por 100.000 habitantes.

ETIOLOGÍA

TABACO

El tabaco desempeña un papel dominante como causa del cáncer de pulmón, siendo el responsable de hasta un 90% de la epidemia del cáncer de pulmón, no sólo de forma directa sino también indirectamente (fumadores pasivos) y en asociación con otras sustancias, como el asbesto y el radón.⁸

La relación causal entre fumar tabaco y el cáncer de pulmón se estableció mediante estudios epidemiológicos, llevados a cabo en los años cincuenta y sesenta. La complejidad del humo del tabaco, con unos 3.000 compuestos químicos diferentes, ha hecho difícil la identificación de la contribución de más de 40 agentes carcinogénicos putativos. Los carcinógenos en el humo del tabaco incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), N-nitrosaminas, aminas aromáticas, sustancias orgánicas (benceno, acrilonitrilo) e inorgánicas (arsénico, acetaldehído) y el polonio 210. La composición del humo depende de las condiciones ambientales donde se fume, de la mezcla de las hojas del tabaco, de los filtros, de los aditivos y del papel de envolver. El humo del tabaco de pipas y puros es más fuerte y más alcalino que el producido por los cigarrillos. Los fumadores de pipas y puros tienen más riesgo de cáncer de pulmón, que los no fumadores. La mayoría de los componentes del tabaco se producen en un ambiente deficiente en oxígeno y rico en hidrógeno, que viene de la pirolisis y la destilación, de la región inmediatamente por detrás de la zona de quemado del cigarrillo. La concentración de la nicotina es adictiva, aunque no es carcinogénica^{9,10}.

El humo que aparece en la combustión del tabaco contiene aproximadamente entre 10^9 - 10^{10} partículas por ml. Los diámetros aerodinámicos de estas partículas, entre 0,1- 1,0 micrómetros, determinan los sitios de depósito en la vía aérea y en los alveolos del pulmón. La fracción de humo retenido varía mucho según el patrón de inhalación. El análisis del humo del tabaco se separa en partículas o alquitrán (*Tar*) y

las fases gaseosas. Los filtros de acetato de celulosa retiran las nitrosaminas volátiles y los fenoles de forma selectiva. La fracción neutral de la fase de partículas contiene iniciadores tumorales potenciales como los PAHs¹⁰.

En países desarrollados el tabaco es el responsable del 24% de todas las muertes en hombres y del 7% en mujeres. Estas cifras aumentan hasta un 40% en algunos países de Europa del este y hasta un 17% en las mujeres de Estados Unidos. El tabaco mata cada año a 3.000.000 de personas en el mundo¹¹. Fumar ha sido claramente identificado como causa directa de cáncer de pulmón, estómago, esófago, orofaringe, laringe, páncreas, vejiga, riñón, leucemias¹². También como agente causal de patología cardiovascular, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), ictus, neumonías. La mitad de los fumadores morirán debido a su hábito¹¹.

HUMO DE TABACO AMBIENTAL

La asociación causal entre fumadores pasivos y el cáncer de pulmón, puede explicar el 1,6% de los cánceres de pulmón¹³. Los resultados de un meta-análisis¹⁴ y una revisión¹⁵, mostraba un riesgo relativo entre 1,14 y 5,20 en las personas que no habían sido fumadores, pero que vivían con un fumador.

La exposición ambiental en el hogar y en el trabajo en España puede ser el responsable de 1.228-3.237 de las muertes de cáncer de pulmón y de enfermedad isquémica cardíaca¹⁶. En un meta-análisis de estudios hechos exclusivamente en mujeres no fumadoras, se mostraba un incremento del riesgo de cáncer de pulmón de hasta un 20% debido al humo de tabaco ambiental¹⁷.

En 2005, se publicó un estudio caso-control población EPIC (European Prospective Investigation into Cancer), que consistía en más de 500.000 voluntarios de diez países europeos entre 1993 y 1998. Este estudio incluyó 123.479 no fumadores o ex fumadores en la cohorte con datos de exposición al humo de tabaco ambiental. Este estudio no mostró datos concluyentes respecto al desarrollo de cáncer de pulmón por exposición al humo de tabaco ambiental¹⁸.

EXPOSICIÓN A LOS HUMOS DE COCINAR

Se ha descrito la presencia de compuestos carcinogénicos en los humos de cocinar de los aceites fritos¹⁹. Se ha relacionado con la aparición de cáncer de pulmón en mujeres no fumadoras chinas²⁰.

SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA HEREDITARIA

La agregación familiar del cáncer de pulmón, se ha comunicado en repetidas ocasiones, sugiriendo un componente hereditario²¹.

Se ha observado mayor riesgo de cáncer de pulmón en los portadores, en la línea germinal, de mutaciones en el gen TP53. Los portadores de estas mutaciones, que fuman, tienen una probabilidad 3 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón, que los portadores que no fuman²².

También se ha descrito la relación entre la mutación en la línea germinal del receptor del factor epidérmico de crecimiento (EGFR) con la aparición de múltiples casos de cáncer de pulmón no célula pequeña en una familia²³.

Recientemente, se ha identificado un nuevo locus de mayor susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón en la región cromosómica 6q23-25p²⁴. Alteraciones en este cromosoma se han relacionado de forma más específica con una mayor susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón en no fumadores y en fumadores no excesivos²⁵.

Por otro lado, tres estudios genéticos independientes han encontrado un marcador en el cromosoma 15 asociado al cáncer de pulmón. El riesgo de padecer cáncer de pulmón en los portadores de una copia de este marcador es del 30% más elevado y hasta un 70-80% en los portadores de 2 copias. La región donde se encuentra este marcador contiene 3 genes que codifican las subunidades del receptor nicotínico de la acetilcolina^{26,27,28}.

EXPOSICIÓN OCUPACIONAL Y AMBIENTAL

RADÓN

El radón es un producto de degradación del uranio, que se ha asociado con la aparición de cáncer de pulmón en los mineros en minas de uranio²⁹.

El radón emite partículas alfa, induciendo daños en el ADN de las células epiteliales respiratorias. La radiación alfa se asocia con la inactivación del gen supresor p16, induciendo su metilación³⁰.

El radón está presente en el suelo y en el aire como contaminante. La exposición a radón entre la población general se asocia con un incremento del riesgo de cáncer de pulmón³¹.

El estudio "The Iowa Radon Lung Cancer Study" investigó el papel de la exposición ambiental al radón en el desarrollo de cáncer de pulmón, demostrando mayor riesgo de desarrollarlo con la exposición y que a mayor nivel de exposición a radón, mayor riesgo de desarrollo³².

ASBESTO

La exposición ocupacional al asbesto se ha asociado al desarrollo de cáncer de pulmón³³.

El riesgo de cáncer de pulmón por asbesto es dependiente tanto de tipo de fibra como de la dosis^{34,35,36}.

En un estudio de cohortes en Holanda, en población expuesta al asbesto de tipo ocupacional, se comunicó un incremento en el riesgo relativo para cáncer de pulmón de 3,5, ajustando por edad, hábito tabáquico y la ingesta de vitaminas³⁷.

En un estudio retrospectivo poblacional, en zonas de Quebec dedicadas a la minería de asbesto, comunicó que la mortalidad por cáncer de pulmón en el marco no ocupacional (mujeres) es insignificante.³⁸.

FACTORES HORMONALES

Tanto en el tejido normal pulmonar, como en el procedente de lesiones cancerosas, se han detectado receptores de estrógenos en hombres y en mujeres^{39,40,41}. Sin embargo, hasta el momento no existen datos concluyentes de la relación entre terapias hormonales y cáncer de pulmón⁴².

VIRUS ONCOGÉNICOS

Se conoce la asociación entre el carcinoma de células escamosas de cérvix, piel, esófago y vías aéreas superiores y el virus del papiloma humano (HPV), surgiendo la posibilidad del papel de este virus en el desarrollo de cáncer de pulmón⁴³.

ENFERMEDAD PULMONAR PREEXISTENTE

Las lesiones pulmonares pre-existentes y las enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las neumonías, el asma y la fibrosis pulmonar idiopática, han sido estudiadas como potenciales factores de riesgo, para el desarrollo de cáncer de pulmón, sin llegar a datos concluyentes^{44,45,46,47}.

1.1.2. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA

El cáncer de pulmón aparece como consecuencia de la acumulación de diferentes anomalías de origen genético y epigenético, que tienen como dianas proto-oncogenes y genes supresores de tumores. El conocimiento de estos cambios puede proporcionarnos la capacidad de detectarlos en el epitelio bronquial y utilizarlos como estrategias de detección precoz de tumores, además de como criterios para implementar, cuando sea posible, estrategias de quimioprevención; también puede ser el origen de nuevos abordajes tanto diagnósticos como terapéuticos.

Muchos de los defectos genéticos somáticos de las células tumorales de las neoplasias pulmonares han sido adquiridos en la vida adulta y están relacionadas con la exposición ambiental a los carcinógenos. Sin embargo, algunas alteraciones genéticas son heredadas y aparecen en todas las células somáticas. Los mecanismos de interacción entre genes y agentes exógenos pueden resultar de la alteración motivada por determinados agentes ambientales, en la expresión de genes, que regulan el ciclo celular, las señales intercelulares y la apoptosis. Los genes susceptibles, además, incluyen aquellos que participan en la fiabilidad de la reparación del ADN, su replicación y la estabilidad genómica. Los individuos con alteraciones en los sistemas enzimáticos de activación o detoxificación pueden tener más riesgo de padecer cáncer de pulmón, incluso, con exposiciones a dosis bajas de humo de tabaco.

De las proteínas esenciales en el metabolismo de los carcinógenos, sobre todo del humo del tabaco, las mejor estudiadas son el CYP1A1 y GSTM^{48,49,50}. El CYP1A1 es un miembro del gran sistema enzimático de los Citocromos P450 (CYP), que son enzimas tipo I, que activan carcinógenos y permiten, así su unión al ADN.

GSTM1 es una forma activa del sistema enzimático Glutation-S. Transferasa, que es una enzima de tipo II, que ejerce su acción inactivando carcinógenos, como los metabolitos reactivos de los PAHs. Si un individuo presenta polimorfismos inactivos como GSTM1-null, también se incrementa el riesgo de cáncer de pulmón.

Los proto-oncogenes son aquellos genes, que tras sufrir una mutación se transforman en oncogenes. Los más conocidos en cáncer de pulmón son ERBB-1 y ERBB-2.

El ERBB-1 se conoce como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), porque codifica la proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico. Se expresa en la mayoría de los CPNCP y se asocia a mal pronóstico^{51 52}.

Otros proto-oncogenes relacionados con el cáncer de pulmón, son los del grupo RAS, el más conocido el KRAS, que está presente en más del 30% de los adenocarcinomas.

En el grupo de alteraciones de los genes supresores tumorales, se incluyen las de los genes que codifican proteínas que actúan de manera fisiológica en el control del crecimiento, división celular y en la reparación del ADN aberrante. Lo patológico es su inactivación, que en muchas ocasiones, se debe a la pérdida de heterocigosidad (*Loss of heterocigosity*: LOH). Los mejor estudiados son RB, P16 y P53.

Las alteraciones de p53 están presentes en más del 50% de todos los tipos morfológicos de cáncer de pulmón y su inactivación se correlaciona con el tabaquismo, además de que confiere mal pronóstico^{53,54}. De p53 hablaremos ampliamente más adelante.

El gen TP16, puede inactivarse por LOH, pero con frecuencia se inactiva por metilación aberrante del promotor del gen^{55,56}.

En otro grupo, se incluyen las alteraciones de los genes encargados de la reparación del ADN. Se trata de proteínas que regulan el ciclo celular y que reparan el ADN aberrante e impiden su replicación. Destacan las alteraciones del gen FHIT (*Fragile Histidina Triad*), que se encuentra en la región del gen 3p14.2. Se ha especulado que los *fragile sites* observados en el genoma humano corresponde frecuentemente con regiones reorganizadas en cáncer.

Por otro lado, existen muchos trabajos sobre polimorfismos que afectan a los genes implicados en la reparación de las bases nitrogenadas (XRCC1) o a la reparación de nucleótidos (XPD).

La actividad de la telomerasa es otro punto de interés en la biología del cáncer de pulmón. El descubrimiento de que la actividad de la telomerasa está silenciada en el

tejido normal, pero que está activada en aproximadamente el 85-90% de todos los cánceres ha hecho que crezca el interés por el papel de esta en la patogénesis, diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón. El ADN humano telomérico está formado por una cadena doble de repetitivas TTAGGG, seguidos por una única cadena en el extremo 3' G- rico. Las proteínas específicas de telómero se unen directamente a la cadena por la región de única o doble cadena, formando un complejo protector sobre el final de los cromosomas, que los protege de la degradación terminal, recombinación^{57,58,59,60}. Además los telómeros sirven de medio para completar la replicación de los cromosomas y contribuyen a la organización funcional de estos en el núcleo. Finalmente, los telómeros sirven como reloj molecular, que controla la capacidad replicativa de las células y su entrada en senescencia^{61,62,62}.

La disfunción del telómero conduce a una rápida inducción del arresto del crecimiento celular o a la apoptosis⁶³.

Por lo tanto, no podemos concluir que existe un único proceso que sea el desencadenante de la aparición de un cáncer de pulmón. En cambio, vemos que existen varios procesos, que pueden darse de forma simultánea o consecutiva, poniendo en evidencia la complejidad de la patogénesis tumoral.

1.1.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y PATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

CÁNCER DE PULMÓN (CP)

La principal división patológica que se hace del cáncer de pulmón es dividirla en dos grupos bien diferenciados histológicamente y en cuanto al abordaje terapéutico y pronóstico. Esta división consiste en el cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) o microcítico y en el de no célula pequeña (CPNCP).

Me voy a centrar en el estudio de los CPNCP, dado que es el subgrupo de pacientes que vamos a analizar, haciendo una breve reseña al CPCP.

CARCINOMA MICROCÍTICO DE PULMÓN O DE CÉLULA PEQUEÑA

El CPCP representa el 12- 17% de los tumores de pulmón^{1,64}.

El estadio es el factor pronóstico fundamental. Los estudios de extensión tienen la importancia de distinguir a pacientes con enfermedad ubicada en el tórax, de aquellos con enfermedad metastásica. Los procedimientos diagnósticos más comúnmente utilizados son la analítica general, la tomografía axial computerizada(TAC) de tórax y abdomen, TAC o resonancia magnética nuclear(RMN) de sistema nervioso central y la gammagrafía ósea. El sistema de estadiaje más comúnmente utilizado es el desarrollado por la *Veterans Administration Lung Cancer Study Group*, que lo que hace es diferenciar simplemente en dos grupos: Enfermedad Limitada al Tórax (EL) y Enfermedad Extendida (EE). La definición clásica de Enfermedad Limitada a Tórax es de tumor confinado al hemitórax de origen, mediastino y ganglios supraclaviculares, que puede ser incluido en un campo tolerable de radiación. Pero no ha habido una definición universalmente aceptada de este término, y pacientes con derrame pleural, tumores pulmonares de gran tamaño, o adenopatías supraclaviculares contralaterales, han sido incluidos o excluidos del concepto de enfermedad limitada por diversos grupos.

La definición de EE es aquella que sobrepasa los límites de definición de EL⁶⁵. Esta clasificación ha sido utilizada en los últimos 50 años, pero actualmente, se recomienda el uso del TNM también en CPCP⁶⁶.

El CPCP se caracteriza por su gran tendencia a la diseminación y sin ningún tipo de tratamiento, su pronóstico es de 2 a 4 meses de vida desde el diagnóstico. Estrategias de tratamiento locales como única actitud, raramente producen supervivencias prolongadas⁶⁷. La poliquimioterapia ha mejorado claramente los resultados tanto en EL como en EE, con un índice de respuestas globales de 80-90% y de mediana de supervivencia de 12-20 meses para pacientes con EL, y 60-80% de respuestas globales y mediana de supervivencia de 7-11 meses para EE, aunque menos del 3% de los pacientes de este último grupo alcanzarán 3 años de supervivencia⁶⁸.

CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA DEL CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN

Existen diversas clasificaciones nosológicas del CP. Desde el punto de vista microscópico la más utilizada es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualizada en el año 2004⁶⁹, que se basa en criterios de microscopia óptica.

Casi la totalidad de los cánceres de pulmón son carcinomas (99%); de éstos, el carcinoma epidermoide es el más frecuente, ya que supone el 44% de los carcinomas en el varón y el 25% en la mujer. El adenocarcinoma, el segundo más frecuente, corresponde al 28% de los casos en el varón y el 42% en la mujer⁶⁴. En los últimos años se observa un aumento de la incidencia del adenocarcinoma.

La combinación de varios tipos histológicos es frecuente en las neoplasias pulmonares, lo que dificulta su clasificación. La inmunohistoquímica no siempre permite solucionar este problema, como en un principio se pensaba, dado que existe un gran solapamiento de los perfiles antigénicos de diferentes tipos histológicos.

De manera general, los marcadores más utilizados en el estudio del carcinoma pulmonar son las citoqueratinas(CK), la apoproteína A del surfactante(SP-A) y el factor de transcripción 1 del tiroides (TTF-1). Las CK están presentes en todos los carcinomas, aunque su expresión disminuye a medida que se produce la desdiferenciación del tumor; el subtipo de CK varía según el subtipo del carcinoma. La proteína SP-A se expresa aproximadamente en la mitad de los adenocarcinomas y en una proporción variable de los otros carcinomas. El TTF-1 se expresa normalmente en el tejido pulmonar y se está convirtiendo en uno de los marcadores más útiles para detectar carcinomas primitivos de pulmón y diferenciarlo así de las metástasis. Los tumores mesenquimales tienen patrones de expresión característicos. Los carcinomas escamosos suelen ser p63+.

CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS CARCINOMAS DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (CPCNP) DE LA OMS Y LA ASOCIACIÓN INTERNACIONAL PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE PULMÓN⁶⁹

1. Carcinoma de células escamosas.

- Papilar.
- Células claras.
- Células pequeñas.
- Basaloides.

Adenocarcinoma.

- Acinar.
- Papilar.
- Carcinoma bronquioloalveolar.
 - No mucinoso.
 - Mucinoso.
 - Mucinoso y no mucinoso mixto o de tipo celular indeterminado.
- Adenocarcinoma sólido con mucina.
- Adenocarcinoma con subtipos mixtos.
- Variantes.
 - Adenocarcinoma fetal bien diferenciado.
 - Adenocarcinoma mucinoso (coloide).
 - Cistoadenocarcinoma mucinoso.
 - Adenocarcinoma de células en anillo de sello.
 - Adenocarcinoma de células claras.

Carcinoma de células grandes.

- Variantes.
 - Carcinoma neuroendocrino de células grandes.
 - Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado.
 - Carcinoma basaloide.

- Carcinoma semejante a linfopitelioma.
- Carcinoma de células claras.
- Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide.

Carcinoma adenoescamoso.

Carcinoma con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos.

- Carcinoma de células fusiformes o gigantes.
- Carcinoma fusiforme.
- Carcinoma de células gigantes.
- Carcinosarcoma.
- Blastoma pulmonar.

Tumor carcinoide.

- Carcinoide típico.
- Carcinoide atípico.

Carcinoma de tipo de glándulas salivales.

- Carcinoma mucoepidermoide.
- Carcinoma quístico adenoide.
- Otros.

Carcinoma no clasificado.

CARCINOMA EPIDERMOIDE O DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Es un tumor epitelial maligno que tiene características de diferenciación escamosa (queratinización y/o puentes intercelulares). Es el tumor pulmonar más frecuente en los países occidentales y está relacionado con el consumo de tabaco.

La mayoría de los carcinomas epidermoides surgen de los bronquios principales, lobares o segmentarios. Sin embargo, puede que esta tendencia esté cambiando, ya que en un estudio se ha observado que un 53% de los carcinomas epidermoides se localiza en la periferia^{70,71}. Se trata de tumores blancos o grises, con áreas centrales de antracosis y retracción en forma de estrella en la periferia. Este tipo de tumor puede presentar un crecimiento endobronquial o invasivo y suele cavitarse⁶⁹.

Una característica de este tipo de tumor es su extensión in situ a lo largo de la mucosa bronquial, que no se observa ni en el carcinoma de célula pequeña ni en el adenocarcinoma.

Se clasifican según el grado de diferenciación del tumor:

- **Tumores bien diferenciados.** Las células presentan una arquitectura en empalizada con citoplasma eosinofílico amplio y núcleo redondo u oval, y cuando los límites celulares están bien delimitados y tiene puentes intercelulares.
- **Tumores moderadamente diferenciados.** Presentas las características citadas en menor grado, mayor atipia citológica y un aumento de la actividad mitótica.
- **Tumores pobremente diferenciados.** Se observa una marcada atipia citológica, un aumento de la actividad mitótica, y un patrón de necrosis tipo comedo.

El carcinoma epidermoide tiende a ser localmente agresivo, y afecta a las estructuras adyacentes por contigüidad. Las metástasis a distancia son mucho menos frecuentes que en el adenocarcinoma⁷².

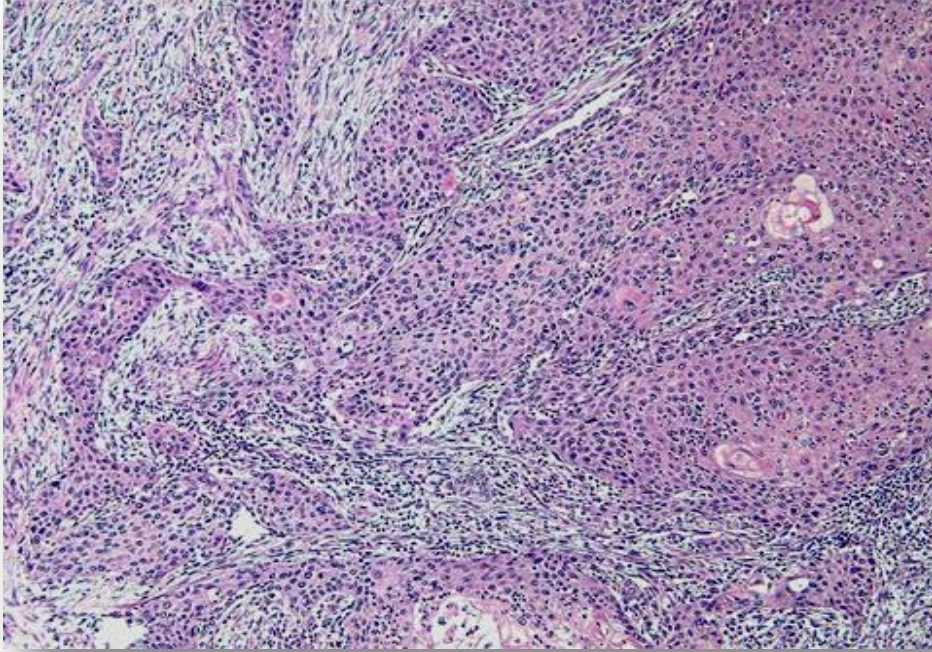


Figura 5: Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Imagen cedida por el hospital clínico de Santiago de Compostela.

Variantes del carcinoma epidermoide

- 1.- Papilar.** Es un tipo con crecimiento endobronquial exofítico.
- 2.-De células claras.** Formado en su totalidad por células con un citoplasma claro por acumulación de glucógeno.
- 3.- De células pequeñas.** Con células tumorales de pequeño tamaño que se asemejan a un carcinoma microcítico y presentan diferenciación focal escamosa. El diagnóstico diferencial se plantea con un tumor microcítico con áreas de carcinoma epidermoide⁷³.
- 4.- Basaloide.** Los nidos tumorales presentan una empalizada periférica y el tumor ocupa los espacios alveolares sin causar destrucción de la red alveolar.

ADENOCARCINOMA

El adenocarcinoma (ADC) es un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o producción de mucina. Es el tipo histológico más frecuente en muchos países, en los que su incidencia ha sobrepasado al carcinoma epidermoide.

Anatómicamente, puede ser un tumor único o múltiple, que suele localizarse en la periferia del pulmón, provocando un engrosamiento focal de la pleura, con retracción de la misma. También puede presentar otros patrones macroscópicos característicos: endobronquial, difuso tipo neumónico, multifocal, pseudomesoteliomatoso o sobre fibrosis.

Histológicamente, presenta varios patrones de crecimiento que pueden aparecer aislados o combinados en diferentes áreas del mismo tumor. Lo más frecuente es que se dé una combinación de varios patrones histológicos, lo que dará lugar al denominado adenocarcinoma mixto. Este subtipo tumoral conforma aproximadamente el 80% de los adenocarcinomas resecaados quirúrgicamente y suele presentar, además de la mezcla de tipos histológicos, diversos grados de diferenciación y atipia según la zona del tumor considerada⁷⁴. Cuanto más grande es el adenocarcinoma, más frecuente es que presente diferentes patrones histológicos combinados. En todos los subtipos de adenocarcinoma puede existir un grado variable de fibrosis estromal e inflamación.

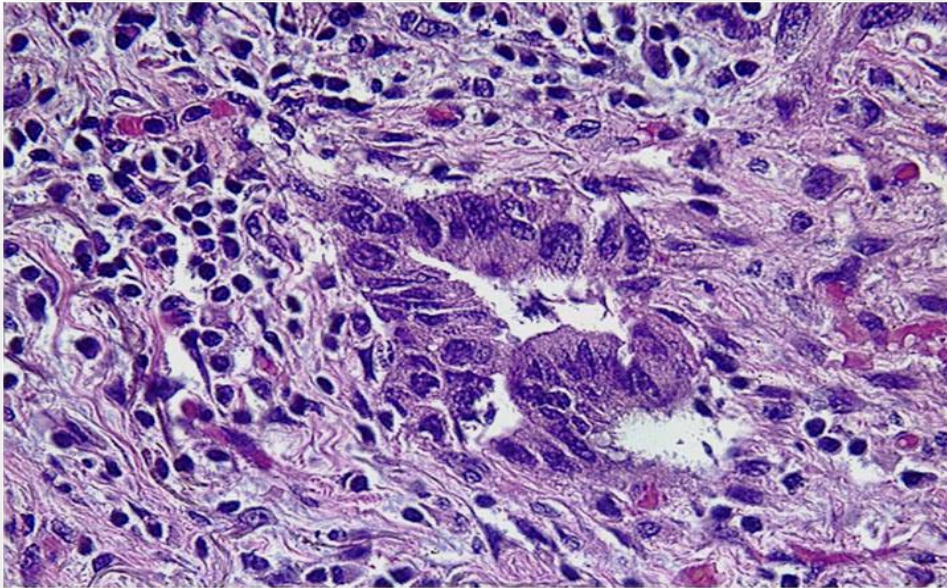


Figura 6: Adenocarcinoma de pulmón moderadamente diferenciado. Estructura acinar. Imagen cedida por el hospital clínico de Santiago de Compostela.

Los principales subtipos son:

- **Patrón acinar.** Presencia de acinos y túbulos.
- **Patrón papilar.** Muestra papilas con ramificaciones papilares secundarias o terciarias que sustituyen la arquitectura pulmonar normal.
- **Adenocarcinoma sólido con producción de mucina.** Es una proliferación de células poligonales que se disponen en sábana, sin formar ni acinos, ni túbulos, ni papilas y que producen mucina.
- **Patrón bronquioloalveolar (BAC).** Existen dos variantes de este patrón: una variante no mucinosa y la variante mucinosa, ⁶⁹. Clásicamente, el adenocarcinoma bronquioloalveolar era considerado un tipo histológico diferente al adenocarcinoma, y no sólo un patrón de crecimiento típico de un subtipo tumoral.

El hecho de que presente un comportamiento morfológico propio, junto con el comportamiento biológico característico, con un pronóstico más favorable, hace que la decisión de la OMS de eliminarlo como entidad independiente, no sea compartido por muchos⁷⁵.

Recientemente, se ha publicado una revisión de la clasificación multidisciplinar del adenocarcinoma de pulmón, en el que desaparecen los términos BAC y adenocarcinoma de subtipo mixto, y se introducen conceptos como adenocarcinoma in situ y adenocarcinoma mínimamente invasivo⁷⁶.

Variantes de adenocarcinoma pulmonar

1.- Adenocarcinoma fetal. Presenta elementos glandulares que recuerdan a los túbulos del pulmón fetal.

2.- Adenocarcinoma mucinoso (coloide). Presenta células neoplásicas epiteliales flotando en grandes lagos de mucina que van disecando el parénquima.

3.-Cistoadenocarcinoma mucinoso. Es una variante bien delimitada, que incluso puede tener una cápsula fibrosa. En la zona central aparece una formación quística, con acumulación de mucina y células mucosas neoplásicas tapizando las paredes alveolares.

4.- Adenocarcinoma de células en anillo de sello. Es una variante infrecuente.

5.- Adenocarcinoma de células claras. Generalmente, la diferenciación con células claras es focal, pero de forma excepcional puede ser el componente principal del tumor.

CARCINOMA DE CÉLULA GRANDE

Por definición, los carcinomas de célula grande son tumores escasamente diferenciados. Se trata de un diagnóstico de exclusión después de haber descartado la presencia de componente de carcinoma escamoso, adenocarcinoma o carcinoma de células pequeñas. Estos carcinomas están formados por nidos de células poligonales grandes con núcleo vesicular y nucléolo prominente, bordes bien definidos, una cantidad moderada de citoplasma y escasa estroma fibrovascular. Ultraestructuralmente, en la mayoría se observa un componente escamoso o glandular.

Macroscópicamente, la mayoría de tumores tienen una localización periférica.

El tumor invade con frecuencia la pleura visceral, la pared torácica o estructuras adyacentes. Al corte, el tumor tiene una coloración pardo rosada, con frecuentes áreas de necrosis, y no suele presentar pigmento antracótico por su crecimiento compresivo. Las metástasis se dan en mayor frecuencia en los ganglios mediastínicos o hiliares, pleura, hígado, hueso, cerebro, ganglios linfáticos y pericardio^{69,77}.

Tipos histológicos de carcinoma de célula grande

1.-Carcinoma neuroendocrino de célula grande. Este tipo de carcinoma presenta un patrón que sugiere una diferenciación neuroendocrina. Las células tumorales son grandes, con citoplasma moderado o abundante⁷⁸.

2.-Carcinoma de tipo linfoepitelioma. En el núcleo de las células neoplásicas grandes indiferenciadas existe ARN de EBER-1⁷⁹.

3.-Carcinoma de células claras. Está formado por células tumorales con citoplasma claro de forma poligonal.

4.-Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide. Un 10 % de la población tumoral debe consistir en esta tipología de células rabdoide, caracterizadas por glóbulos citoplasmáticos eosinófilos. En éstos, suelen verse focos de adenocarcinoma y positividad para marcadores neuroendocrinos⁸⁰.

1.1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA. DIAGNÓSTICO. ESTADIAJE Y PRONÓSTICO

PRESENTACIÓN CLÍNICA

La mayoría de pacientes con cáncer de pulmón suelen tener síntomas clínicos en el momento de su diagnóstico, si bien es difícil diferenciarlos de los síntomas anteriores, que pueden padecer los pacientes⁸¹. Hay que tener en cuenta que un 90% de los enfermos que sufren un carcinoma de pulmón son fumadores y, en muchos casos, padecen otras enfermedades relacionadas con el tabaquismo como la bronconeumopatía crónica obstructiva.

Las manifestaciones clínicas pueden depender de diversos aspectos como el subtipo histológico, localización, la diseminación locorregional, las metástasis a distancia, los síndromes paraneoplásicos o ser el resultado de una combinación de estos mecanismos.

Se estima que un 10 % de los pacientes pueden estar asintomáticos, alrededor de un 25% pueden tener síntomas relacionados con el tumor primario, el 35% síntomas sistémicos como anorexia, astenia y pérdida de peso relacionados con el tumor, y el 30% síntomas específicos de metástasis. De hecho, la existencia de síntomas puede asociarse significativamente con la supervivencia.

La clínica está claramente relacionada con la localización del tumor primario.

Diferencias por el tipo de crecimiento del tumor primario	
Tumores centrales	Tumores periféricos
Epidermoide	Adenocarcinoma
Microcítico	Carcinoma de células grandes
Síntomas	
Tos seca	Tos
Disnea	Disnea
Estridor	
Hemoptisis	
Fiebre por neumonitis obstructiva	
Dolor torácico sordo, mal localizado	Dolor torácico pleurítico, localizado

Tabla 1: Diferencias por el tipo de crecimiento del tumor primario.

Los carcinomas epidermoides y CPCP suelen tener un crecimiento central. La imagen radiológica típica es la de una masa hilar con o sin afectación del mediastino. La existencia de una cavitación es más frecuente en los carcinomas epidermoides, aunque también puede verse en los carcinomas indiferenciados de células grandes.

Los tumores centrales producirán con más frecuencia síntomas relacionados con los bronquios principales, lobares o segmentarios proximales, como tos, hemoptisis, disnea o síntomas de obstrucción bronquial que puede implicar neumonitis obstructiva y atelectasia.

El adenocarcinoma y el carcinoma indiferenciado de células grandes suelen tener un crecimiento periférico. La imagen radiológica de los tumores periféricos es un nódulo intrapulmonar o un infiltrado pulmonar.

El dolor pleurítico y la afectación pleural pueden ser síntomas de los tumores periféricos. Más del 90% de los pacientes presentarán síntomas en el momento del diagnóstico⁸². Existen estudios que han establecido una relación directa entre la clínica y la posibilidad de tener un tumor metastásico⁸³.

Al describir la clínica del cáncer de pulmón se pueden diferenciar los síntomas que se relacionan con el tumor primario, la extensión locorregional o con la enfermedad metastásica.

SIGNOS Y SÍNTOMAS		
Lesión primaria	Afectación intratorácica	Enfermedad metastásica
Tos	Parálisis N. laríngeo recurrente	Dolor óseo
Disnea	Parálisis N. frénico	Afectación de glándulas suprarrenales
Hemoptisis	Derrame pleural	Afectación hepática
Dolor torácico	SVCS	Adenopatías
	Tumor de Pancoast	Afectación del SNC
	Síndrome de Horner	
	Dolor costal	
	Disfagia	
	Derrame pericárdico	

Tabla 2: Signos y síntomas de acuerdo con el origen de la afectación.

SÍNDROMES PARANEOPLÁSICOS

El cáncer de pulmón es uno de los tumores que se asocian con mayor frecuencia a los síndromes paraneoplásicos, estimándose que entre un 10-20% de estos pacientes desarrollarán esta complicación⁸⁴.

Los síndromes paraneoplásicos son un conjunto de manifestaciones clínicas, originados por la liberación por el tumor de sustancias biológicamente activas o por el desarrollo por parte del enfermo de una respuesta inmunológica anómala contra el tumor. Por lo tanto, no es originado por la invasión directa del tumor ni por sus metástasis, no dependen de su tamaño y pueden preceder al mismo incluso en años, por lo que también han sido denominados “efectos remotos del cáncer”. Las sustancias que producen los síndromes paraneoplásicos suelen ser hormonas segregadas por el tumor en niveles anómalos o de forma ectópica, aunque también pueden ser anticuerpos o citocinas producidas por el huésped.

En el cáncer de pulmón puede producirse un gran número de paraneoplásicos, pero los más frecuentes suelen ser de origen endocrino-metabólico, óseo y neurológico. Los más frecuentes en los CPNCP son la hipercalcemia y la osteoartropatía hipertrófica.

Síndromes paraneoplásico en cáncer de pulmón(I)	
Sistémicos	
Anorexia	Pérdida de peso
Caquexia	
Endocrinos o metabólicos	
Hipercalcemia tumoral	Secreción inadecuada de ADH
Hipersecreción de hormona de crecimiento	Ginecomastia
Síndromes osteoarticulares	
Osteoartropatía hipertrófica	Polimiositis
Acropaquias	
Hematológicos	
Anemia	Tromboflebitis superficial
Granulocitosis	Endocarditis trombótica no bacteriana
Trombocitosis	
Coagulación intravascular diseminada	
Neurológicos	
Degeneración cerebelosa subaguda	Síndrome de Eaton-Lambert
Neuropatía sensitiva subaguda	Encefalomielitis
Mononeuritis múltiple	Neuritis óptica
Mielopatías	

Tabla 3: Síndromes paraneoplásicos asociados a CP (I).

Síndromes paraneoplásico en cáncer de pulmón (II)	
Renales	
Glomerulonefritis membranosa	Síndrome nefrótico
Cutáneos	
Acantosis nigricans	Eritema gyratus repens
Hipertrichosis lanuginosa adquirida	Dermatomiositis
Acroqueratosis paraneoplásica de Bazex	

Tabla 4: Síndromes paraneoplásicos asociados a CP (II).

DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE

El diagnóstico y la estadificación se basan en una completa historia clínica y exploración física. Se debe conocer la historia natural de la enfermedad precoz y metastásica, para orientar la anamnesis y la exploración.

Toda la estrategia de diagnóstico y de la estadificación debe orientarse a la identificación de pacientes que puedan ser inicialmente operados o tratados mediante neoadyuvancia para luego ser sometidos a la resección quirúrgica, ya que la cirugía es prácticamente el único tratamiento curativo.

La realización de una u otra técnica diagnóstica dependerá de su capacidad para diagnosticar y establecer el estadio de la enfermedad, así como de la posibilidad de evitar pruebas invasivas, poniendo especial atención en el probable tratamiento.

A los pacientes que sufran un derrame pleural por primera vez debería practicárseles una toracocentesis, ya que podría tratarse de un derrame maligno o paramaligno.

Es importante diferenciar entre ambos, porque condiciona un estadio y tratamiento diferentes.

Cuando aparezcan síntomas consuntivos y de afectación específica de órganos, deberemos sospechar extensión metastásica y el método diagnóstico puede centrarse en la obtención de material histológico de estas zonas mediante biopsia o citología.

ESTUDIOS DE IMAGEN

Radiografía de tórax

En pacientes asintomáticos puede ser el primer motivo de sospecha y es la piedra angular en la detección del cáncer de pulmón. Objetiva si se trata de una masa o nódulo único o lesiones múltiples, localización, existencia de derrame pleural, atelectasia, afectación ósea y broncopatía previa.

Tomografía axial computarizada (TAC)

La TC de tórax y abdomen superior es muy importante. Informa sobre las características del tumor primario, su extensión locorregional, sobre todo si existe afectación de ganglios mediastínicos, corazón y grandes vasos, esófago, columna vertebral, costillas, paquetes nerviosos y si existen metástasis en hígado o glándulas suprarrenales.

Tomografía con emisión de positrones (PET) sola o asociada a TAC

La PET se basa en las diferencias de metabolismo entre células malignas y normales, mediante la captación de glucosa marcada con un isótopo (18-FDG). También es un método muy valioso para la estadificación ganglionar mediastínica y para el estudio de extensión. La PET-TC es muy útil es el diagnóstico diferencial del nódulo pulmonar solitario. Pero en lesiones de menos de 1 cm o en tumores de escaso recambio celular como los carcinoides o bronquioalveolares puede tener falsos negativos. Puede dar falsos positivos en lesiones inflamatorias o en infecciosas⁸⁵.

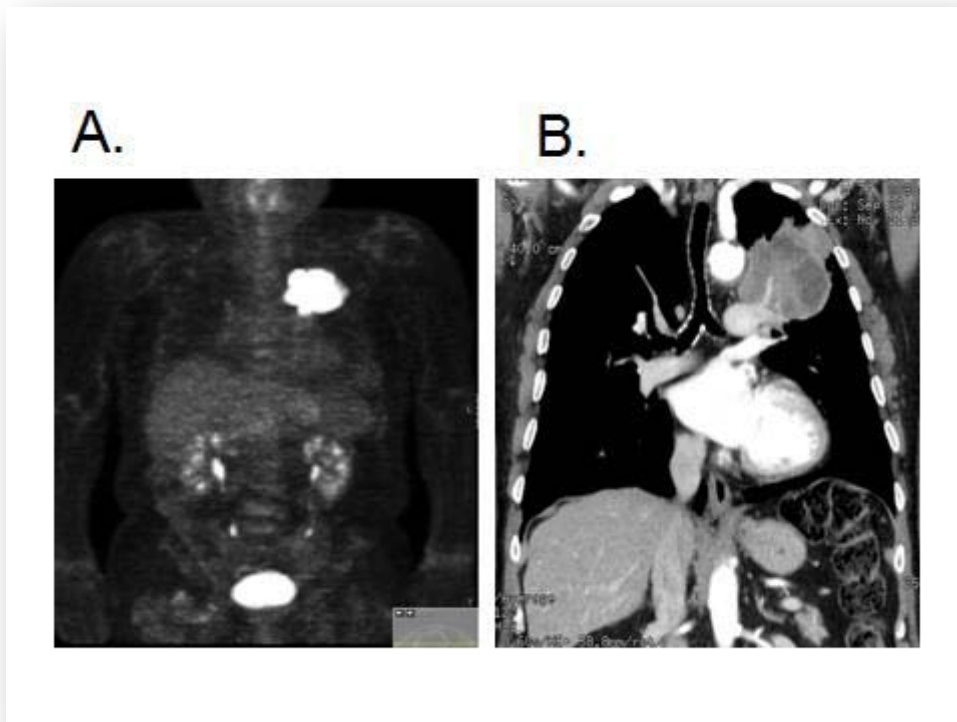


Figura 7: La imagen de la derecha (A) es una imagen de PET que muestra una hipercaptación pulmonar izquierdo sugestivo de neoplasia, que coincide con la imagen de TAC (B) y que se trata de un carcinoma epidermoide de pulmón.

ESTUDIOS PARA OBTENER TEJIDO

Citología de esputo

Técnica poco invasiva. Es útil en los tumores centrales y que cursan con hemoptisis. Es una alternativa en pacientes que no sean candidatos a realizar broncoscopia.

Fibrobroncoscopia

Es una prueba fundamental. Permite localizar la situación endobronquial y su extensión a bronquios principales y tráquea. Permite tomar biopsia del tumor y de los ganglios afectados. Se puede encontrar afectación endobronquial exofítica o una infiltración submucosa o compresión extrínseca. Se recomienda la toma, al menos de tres muestras.

Punción con aspiración pulmonar percutánea guiada por TAC

Es una alternativa para obtener material citológico mediante control radiológico, cuando se trata de tumores periféricos no accesibles por broncoscopio.

Exploración y estadificación ganglionar del mediastino

En el periodo previo a la PET y a las técnicas endoscópicas con posibilidad de biopsia ganglionar (Eco-endoscopia con PAAF (punción-aspiración con aguja fina), se realizaba una exploración quirúrgica del mediastino sistemática, a todos los pacientes con enfermedad susceptible de cirugía curativa y sospecha de extensión a mediastino.

Desde que existen estas técnicas, se reserva la mediastinoscopia/mediastinotomía, para aquellos casos en que sospecha metástasis ganglionares (TAC o PET positivos) y la PAAF no muestra células malignas⁸⁶.

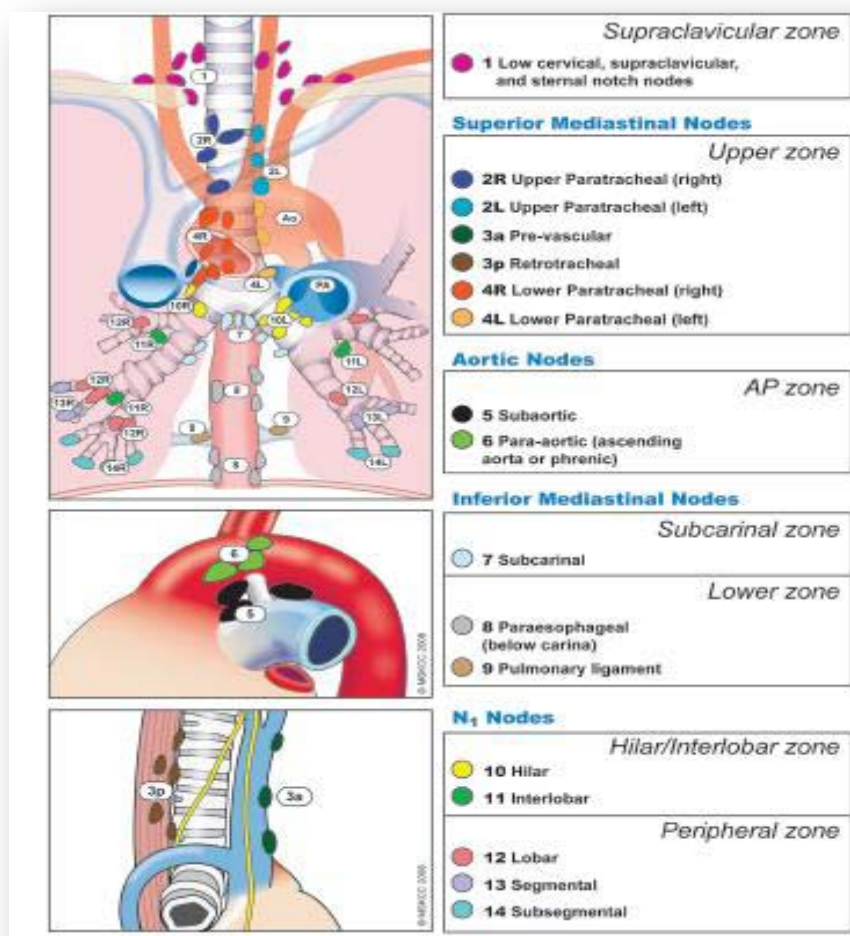


Figura 8: Mapa de los ganglios linfáticos de la IASLC.

ESTADIFICACIÓN CLÍNICA

Pretende establecer la situación del tumor de acuerdo con el patrón habitual de diseminación de esta neoplasia y se utiliza el sistema TNM.

- El parámetro "T" tumor, se define por el crecimiento del tumor primario en tamaño en el parénquima pulmonar, o su extensión a estructuras vecinas.
- El parámetro "N" ganglios linfáticos regionales, describe la afectación ganglionar hilar o mediastínica ipsi o contralateral.
- El parámetro "M" metástasis, se refiere a la presencia de metástasis a distancia.

La clasificación TNM utilizada hasta ahora y en el presente trabajo es la de 1997. Recientemente, se ha actualizado, por lo que presento también, la clasificación TNM actual y una tabla comparando ambas clasificaciones, para que estos cambios sean más visibles.

Sistema Internacional de Estadificación TNM para Cáncer de Pulmón 1997⁶⁵

TUMOR (T) DESCRIPCIÓN DE ESTADO

- **T0:** No evidencia de tumor primario
- **TX:** Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor certificado por la presencia de células malignas en el esputo o lavado bronquial pero no visualizado por imágenes o broncoscopia.
- **TIS:** Carcinoma in situ
- **T1:** Tumor <3 cm en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar (no en bronquio principal).
- **T2:** Tumor con cualquiera de los siguientes: >3 cm en su diámetro mayor; compromiso de bronquio principal, ≥ 2 cm distal de la carina; invasión de pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva extendida al hilio pero que no compromete el pulmón entero.

- **T3:** Tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), diafragma, pleura mediastinal, pericardio parietal; o tumor en bronquio principal <2 cm distal de la carina pero sin compromiso de esta; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva del pulmón entero.
- **T4:** Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales, carina; o tumor con derrame pleural o pericárdico maligno^a, o con ganglio(s) tumoral satélite dentro del lóbulo tumoral primario ipsilateral del pulmón.

GANGLIOS LINFÁTICOS (N) DESCRIPCIÓN DEL COMPROMISO

- **NX:** Ganglios linfáticos regionales que no pueden ser evaluados.
- **N0:** No metástasis en ganglios linfáticos regionales.
- **N1:** Metástasis en ganglios linfáticos peribronquial ipsilateral y/o hiliar ipsilateral, y compromiso de ganglios intrapulmonares por extensión directa del tumor primario.
- **N2:** Metástasis de ganglio(s) linfáticos ipsilateral mediastinal y/o subcarinales.
- **N3:** Metástasis de ganglio(s) linfáticos mediastinales contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ipsilaterales o contralaterales, o supraclaviculares.

METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

- **MX:** No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia.
- **M0:** No metástasis a distancia.
- **M1:** Presencia de metástasis a distancia^b.

^a La mayoría de los derrames pleurales asociados con cáncer de pulmón son debidos al tumor. Sin embargo, en algunos pacientes con múltiples exámenes citopatológicos negativos de derrames pleurales no sanguinolentos, no exudativos o pericárdicos, que el juicio clínico dicta que no están relacionados al tumor, el derrame debería ser excluido como elemento de estadificación de la enfermedad del paciente como T1, T2, o T3.

^b Los nódulo(s) tumorales metastásicos alejados en el lóbulo(s) tumoral no primario ipsilateral del pulmón son clasificados como M1.

En la siguiente figura recogida del artículo de Mountain et al., de 1997, se recoge una relación de la supervivencia según el estadio clínico y patológico.

ESTADIOS CLÍNICO Y PATOLÓGICO					
	MESES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (Porcentaje de supervivencia acumulada)				
	12(%)	24(%)	36(%)	48(%)	60(%)
cEstadio					
cIA(n=687)	91	79	71	67	61
cIB(n=1189)	72	54	46	41	38
cIIA(n=29)	79	49	38	34	34
cIIB(n=357)	59	41	33	26	24
cIIIA(n=511)	50	25	18	14	13
cIIIB(n=1030)	34	13	7	6	5
cIV(n=1427)	12	6	2	2	1
pEstadio					
pIA(n=511)	94	86	80	73	67
pIB(n=549)	87	76	67	62	57
pIIA(n=76)	89	70	66	61	55
pIIB(n=375)	73	56	46	42	39
pIIIA(n=399)	64	40	32	26	23
P<0,05					

Tabla 5: Estadificación quirúrgica y clínica del CPNCP ⁸⁷.

Los estadios clínicos se agrupan así:

ESTADIAJE ANATÓMICO	GRUPOS PRONÓSTICOS		
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
Estadio IIB	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
Estadio IIIA	T3	N0	M0
	T1a	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T1a	N3	M0
	T1b	N3	M0
	T2a	N3	M0
	T2b	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N2	M0
	T4	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a
	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 6: Grupos pronósticos por estadiaje anatómico, de la 7ª edición de la AJCC.

Los cambios del estadiaje resumidos y comparación entre la 6ª y 7ª edición:

T N M		N0	N1	N2	N3
6ª Edición TNM	7ª Edición TNM	Estadio	Estadio	Estadio	Estadio
T1 (≤ 3 cm)	T1a (≤ 2 cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
	T1b (> 2-3 cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (> 3 cm)	T2a (> 3-5 cm)	IB	IIA (IIB)	IIIA	IIIB
	T2b (> 5-7 cm)	IIA (IB)	IIB	IIIA	IIIB
	T3 (> 7 cm)	IIB (IB)	IIIA (IIB)	IIIA	IIIB
T3 invasion	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (nódulos en el mismo lóbulo)	T3	IIB (IIIB)	IIIA (IIIB)	IIIA (IIIB)	IIIB
T4 (extensión)	T4	IIIA (IIIB)	IIIA (IIIB)	IIIB	IIIB
M1 (pulmón ipsilateral)	T4	IIIA (IV)	IIIA (IV)	IIIB (IV)	IIIB (IV)
T4 (derrame pleural)	M1a	IV (IIIB)	IV (IIIB)	IV (IIIB)	IV (IIIB)
M1(pulmón contralateral)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (a distancia)	M1b	IV	IV	IV	IV

Tabla 7: Resumen comparativo de los cambios entre la 6ª y la 7ª edición del TNM

En la siguiente tabla se especifican los cambios en cada componente del TNM.

Componente de clasificación	Novedades introducidas
T	<p>T1 se subclasifica en : -T1a: tumor ≤2cm -T1b: tumor >2cm y ≤3cm T2 se subclasifica en : -T2a: tumor >3cm y ≤5cm(o cualquiera de los descriptores de T2, pero ≤5cm) -T2b: tumor >5 cm y ≤7 cm T2 > 7 cm se reclasifica como T3 T4 por nódulo/s adicional/es en lóbulo del tumor primario se reclasifica como T3 M1 por nódulo/s adicional/es en lóbulo homolateral diferente de aquél del tumor primario se reclasifica como T4 T4 por derrame pleural maligno se reclasifica como M1a</p>
N	Sin cambios
M	<p>M1 se subclasifica en: -M1a: nódulo/s tumoral/es separado/s en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural(o pericárdico) maligno -M1b: metástasis distantes</p>

Tabla 8: Novedades en la séptima edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón⁸⁸.

TRATAMIENTO

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CPNCP

El tratamiento quirúrgico del CPNCP pretende curar esta enfermedad y hasta el momento actual es la única modalidad de tratamiento con capacidad potencialmente curativa.

El objetivo debe ser la extirpación de todo el tejido tumoral y asegurar que no exista enfermedad residual.

El diseño global de la estrategia de tratamiento debe realizarse de forma individual y basándose en la correcta estadificación TNM. El sistema TNM pretende agrupar a los pacientes para plantear una estrategia terapéutica. Se establece según toda la información obtenida en la anamnesis, la exploración física y las exploraciones complementarias. Una vez queda el paciente clasificado en un subgrupo del TNM, existen dos escenarios: pacientes con enfermedad potencialmente reseccable con una resección completa y los que no.

El tratamiento quirúrgico tiene indicación en todos los casos de tumores en estadio I y II⁶⁵, cuando las condiciones del paciente lo toleren. Los pacientes con afectación ganglionar mediastínica N2 (IIIA), no son, en general, candidatos a tratamiento quirúrgico, salvo que sea un hallazgo en el campo quirúrgico.

Los tumores N3 (IIIB) presentan una contraindicación formal para la cirugía de entrada.

Los tumores T4 precisan de una consideración especial, tanto de reseccabilidad como de irreseccabilidad, pero se consideran quirúrgicos si no hay afectación ganglionar mediastínica (T4N0-1).

Intervenciones quirúrgicas

-Neumonectomía.

-Lobectomía.

-Resecciones extendidas.

TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS I Y II

La cirugía es el tratamiento estándar de los estadios I y II⁶⁵. Tras una resección completa, la supervivencia a 5 años oscila entre el 67% para los estadios T1N0 y el 38% para los estadios T2N1 o T3N0.

Los pacientes con estadio IIIA es necesario distinguir a los pacientes con afectación ganglionar microscópica, que de entrada tienen van a tratamiento quirúrgico y presentan una supervivencia a 5 años del 25-40%, de los N2 con afectación macroscópica que tienen una supervivencia a 5 años del 10 %⁶⁵.

Con la finalidad de mejorar estos resultados se han llevado a cabo varios estudios investigando el efecto de la quimioterapia adyuvante. Se publicó el meta-análisis de 1995, con los resultados de 8 ensayos aleatorizados, que utilizaba esquemas con cisplatino en combinación en 1394 pacientes. Se detectó una reducción del riesgo de muerte del 13%, con una mejoría absoluta del 3 y 5% a los 2 y 5 años, respectivamente⁸⁹.

En el escenario de la adyuvancia, hay que destacar 4 estudios fase III randomizados a cirugía sola o a cirugía seguido de quimioterapia adyuvante.

El primero de ellos el estudio IALT, que incluyó 1867 pacientes, con estadio I-III, aleatorizan a los pacientes a quimioterapia adyuvante basada en cisplatino en combinación versus cirugía solamente. Comunicaron diferencias significativas la supervivencia global a 5 años de 44,5 versus 40,5 % (p 0,03) y en la supervivencia libre de progresión a 5 años de 39,4 versus 34,3% (p 0,003), respectivamente y favoreciendo a la quimioterapia adyuvante. Aunque, en el análisis de supervivencia a 7,5 años, se pierde el beneficio significativo (p 0,10)^{90,91}.

El estudio ANITA, con 840 pacientes, es un fase III, abierto y multicéntrico, que aleatorizaba a los pacientes a recibir un esquema de cisplatino y vinorelbina versus observación tras la cirugía, presentaba una mediana de supervivencia

significativamente diferente, de 65,7 versus 43,7 meses (p 0,017), a favor del grupo de quimioterapia⁹².

En el estudio JBR.10, los 482 pacientes con resección completa de cáncer de pulmón, estadiados como pT2N0, pT1N1, pT2N1M0, fueron aleatorizados a recibir un esquema de quimioterapia con cisplatino y vinorelbina versus observación, con una tasa de supervivientes a 5 años del 69% versus el 54%, a favor del grupo de quimioterapia (p 0.03). En este estudio se objetivó que la adyuvancia era beneficiosa para los pacientes a partir del estadio II (no para IB). En el análisis posterior a 9 años se sigue manteniendo el beneficio significativo en supervivencia en pacientes N1⁹³.

El estudio CALGB 9633, aleatorizaba pacientes tras cirugía de cáncer de pulmón no microcítico, T2N0M0 (IB) a recibir 4 ciclos de quimioterapia con un esquema de carboplatino y paclitaxel versus observación, presentaba una mediana de supervivencia diferente, de 95 meses versus 78 meses, pero las diferencias en supervivencia no son significativas (p 0.125). Este estudio es único, porque sólo valoraba pacientes con estadio pT2N0M0 y usaba un esquema de quimioterapia adyuvante diferente. En un análisis posterior de este estudio se objetivó que los tumores T2 mayores o iguales a 4 cm se beneficiaban de este tratamiento⁹⁴.

El estudio de neoadyuvancia, fase III, en pacientes con estadios I, II y III (T3N1) resecables de entrada, el estudio NATCH, no ha demostrado beneficio entre el tratamiento neoadyuvante comparado con el adyuvante. Este estudio tiene tres brazos, uno que va a cirugía de entrada con observación posterior, el otro en el que reciben tres ciclos de carboplatino y paclitaxel neoadyuvante seguido de cirugía y otro en el que se hace cirugía de entrada seguido de tres ciclos del mismo esquema en régimen adyuvante⁹⁵.

En los estadios I, el meta-análisis de estudios de adyuvancia LACE, publicado en 2008, objetiva que el efecto de la quimioterapia puede ser perjudicial⁹⁶. Pero lo cierto es que la mortalidad en los pacientes con estadios I es del 30%. En este momento hay ensayos abiertos que exploran marcadores biológicos de sensibilidad a quimioterapia en el tumor, incluyendo el análisis de ERCC-1⁹⁷ y RRM1⁹⁸. Este es el ensayo SWOG-S072,

que randomiza a los pacientes a un esquema de quimioterapia con cisplatino y gemcitabina o a observación.

TRATAMIENTO DE LOS ESTADIOS III

El estadio III del CPNCP es una enfermedad heterogénea en la que se usan varias combinaciones de quimioterapia, radioterapia y cirugía.

El volumen de la enfermedad, en especial mediastínica, influye en la toma de decisiones. En este estadio se observa una alta tasa de fallo local y de metástasis a distancia, tras el tratamiento con cirugía o radioterapia aisladas. Como consecuencia, el tratamiento combinado con quimioterapia y radioterapia y/o cirugía se emplea en pacientes con buen PS, buena función pulmonar y mínimas comorbilidades.

En los pacientes con estadio IIIA es necesario distinguir a los pacientes con mínima afectación ganglionar, subsidiarios de cirugía después de un tratamiento neoadyuvante, que presentan una supervivencia a 5 años del 25-40%, de los N2 bulky o multiestación, que tienen una supervivencia a 5 años del 10 %⁶⁵.

En el estadio IIIB, el tratamiento con quimioterapia con platino y radioterapia torácica, se considera el tratamiento estándar, siendo la modalidad concomitante la más activa⁹⁹.

En la siguiente figura, se muestra un esquema de las diferentes formas de administrar la quimioterapia y la radioterapia, esquema secuencial, concomitante, de inducción y de consolidación ¹⁰⁰.

TRATAMIENTO SECUENCIAL: QUIMIOTERAPIA → RADIOTERAPIA			
Quimioterapia de inducción	X	X	
Radioterapia			■
QUIMIORRADIOTERAPIA CONCOMITANTE			
Quimioterapia	(x)	(x)	(x)
Radioterapia			■
QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN → QUIMIORRADIOTERAPIA CONCOMITANTE			
Quimioterapia de inducción	X	X	
Quimiorradioterapia concomitante			(x) (x) (x)
Radioterapia			■
QUIMIORRADIOTERAPIA CONCOMITANTE → QUIMIOTERAPIA DE CONSOLIDACIÓN			
Quimiorradioterapia concomitante			(x) (x) (x)
Radioterapia			■
Quimioterapia de consolidación			X X X

Tabla 9: Paradigmas del tratamiento con radioterapia y quimioterapia en CPNCP¹⁰⁰

El tratamiento de radioterapia y/o cirugía se centran en la enfermedad locorregional y la quimioterapia en la a distancia. Un tercer compartimento ha emergido como lugar de recurrencia, el santuario cerebral, que se da en un 20% de los pacientes y que justificaría la radioterapia profiláctica¹⁰¹.

TRATAMIENTO DEL ESTADIO IV

La quimioterapia en el estadio IV, permite un discreto incremento de la supervivencia y contribuye al alivio de síntomas. Desde la década de los 90, diferentes estudios¹⁰²^{103,104} demostraron que las combinaciones de fármacos que incluyen cisplatino mejoran, de forma modesta, tanto la supervivencia como la calidad de vida, frente al tratamiento de apoyo. En el meta-análisis de 1995, se objetivó una reducción del riesgo de muerte del 27%, con mejoría en la supervivencia al año del 10% y de 1,5-2 meses en la media de la supervivencia¹⁰⁵. Estos datos se confirmaron en un ensayo prospectivo, *Big Lung Trial*, que compara diferentes combinaciones de platino¹⁰⁶. Además se observó que el beneficio de la quimioterapia es independiente del performance status (PS)¹⁰⁶.

La combinación de fármacos frente a la monoterapia, ha demostrado mejoría en la tasa de respuesta y un beneficio en supervivencia aproximadamente de 2 meses^{107,108}. En los pacientes con PS0-1, el esquema de elección es una combinación de platino (cisplatino o carboplatino) con un fármaco de tercera generación, como docetaxel, gemcitabina, irinotecán, paclitaxel, pemetrexed y vinorelbina, sin que ninguna combinación se haya demostrado superior a las otras^{109,110}. La actividad de las combinaciones de dos fármacos de última generación, que no incluyan platino, es inferior a las combinaciones con platino. Pero las diferencias en supervivencia no son estadísticamente significativas.^{111,112,113,114}

En el caso del tratamiento de los CPNCP estadio IV, no escamosos, sin M1 cerebrales y sin hemoptisis, se debe tener en cuenta que añadir bevacizumab al tratamiento de quimioterapia, con carboplatino y paclitaxel, aumenta tanto la supervivencia global como la libre de progresión¹¹⁵.

También se ha observado una interacción entre los tratamientos y la histología, en el caso de los CPNCP no escamosos, con respecto a pemetrexed, siendo de una eficacia superior en la histología no escamosa^{116,117}.

Las nuevas terapias dirigidas a dianas moleculares, como gefitinib y erlotinib, han demostrado eficacia en monoterapia ^{118,119,120} y no en combinación con quimioterapia ^{121,122,123,124}. En la actualidad, el uso de gefitinib está restringido a pacientes con mutaciones de EGFR, siendo las más frecuentes las de los exones 19 y 21 ^{118,119,125,126,127} y el de erlotinib en segunda o tercera línea.

Por esto, el estudio del estado mutacional de EGFR es muy importante, ya que de ello se derivan la elección del tratamiento más adecuado. Pero de un modo particular, en el caso del adenocarcinoma, que desde la primera línea de tratamiento del estadio IV, se distingue entre el paciente con adenocarcinoma con mutaciones del EGFR y sin mutaciones. Los pacientes con mutaciones obtienen más beneficio de iniciar una terapia con gefitinib o erlotinib, y los que no las tienen, se tratarían de inicio con quimioterapia basada en una combinación con platino ¹²⁸.

La quimioterapia deberá interrumpirse a la progresión de enfermedad o tras cuatro ciclos si no hay respuesta, y no se administrarán más de seis ciclos de combinaciones de dos fármacos ¹¹⁰. En los pacientes con respuesta o no progresión a quimioterapia con platino, existe una nueva tendencia a los tratamientos de mantenimiento, que hay que individualizar. En el caso de mantenimiento con quimioterapia, existen datos con pemetrexed ¹²⁹ y con terapias dirigidas existen datos con erlotinib ¹³⁰.

1.1.5 FACTORES PRONÓSTICOS

La Asociación Internacional del Cáncer de Pulmón (IASLC) estableció en 1996 un consenso, que identificaba tres factores pronósticos ¹³¹: estadio (TNM), estado general del paciente y pérdida de peso. También se definieron otras variables con valor predictivo: sexo, edad, histología, niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), albúmina, hemoglobina, plaquetas y leucocitos. Sin embargo, la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) sólo considera como factores pronósticos principales el estadio y el estado general ¹³², si bien la pérdida de peso, el sexo, los niveles de LDH y la afectación ósea o hepática también se consideran importantes.

FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS PRECOSES

En los pacientes con estadios precoces de CPNCP, los factores pronósticos más importantes son el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, lo que ha motivado una serie de cambios en la nueva clasificación TNM. La edad y las cirugías distintas de la neumonectomía o lobectomía, también tienen implicación pronóstica.

-TAMAÑO DEL TUMOR

Durante mucho tiempo no se valoró como factor determinante. En los pacientes quirúrgicos, ha sido más importante la reseccabilidad que el tamaño tumoral. Y aunque previamente, se consideró que en pacientes con enfermedad locorregional no subsidiaria de tratamiento quirúrgico, la T no era un factor pronóstico independiente ¹³³, se ha demostrado que la T sí es un factor pronóstico y esto se ha tenido en cuenta en la 7ª edición del TNM, que subclasifica a los T1 y T2 en a y b ¹³⁴.

-ESTADIO

La distribución en cuatro estadios permite planificar el tratamiento, agrupando a los pacientes en grupos homogéneos para poder comparar, ya que existe una correlación clara entre el estadio y la supervivencia.

-HISTOLOGÍA

Aunque en la serie clásica del grupo ECOG¹³⁵ los tumores de células grandes se asocian a un peor pronóstico, en las series de los grupos SWOG¹³⁶, ELCWP¹³⁷ y la del grupo ECOG¹³⁸, no aparece la histología como factor independiente.

-RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

En pacientes con estadios I y II, que se tratan mayoritariamente con cirugía, se considera que la resección mínima necesaria es la lobectomía, excepto en paciente que no puedan tolerar esta cirugía¹³⁹, ya que la aplicación de tratamientos más conservadores está ligada a una supervivencia menor.

-EDAD

Más de la mitad de los casos de cáncer de pulmón se diagnostica después de los 65 años, y en más del 30% de los casos después de los 70 años. Por otro lado, los pacientes mayores de 70 años fueron excluidos de los ensayos clínicos. En la actualidad, la edad biológica no tiene peso como factor pronóstico independiente¹⁴⁰. Aunque es evidente, que la edad avanzada se asocia con frecuencia a comorbilidad, lo que sí condiciona los resultados del tratamiento, tanto en estadios precoces como en avanzados.

OTROS FACTORES PRONÓSTICOS DEPENDIENTES DEL PACIENTE

-COMORBILIDAD

El cáncer de pulmón se asocia al tabaco y es más frecuente en pacientes de edad avanzada, condiciones ambas asociadas a comorbilidad.

En un estudio sobre 1155 paciente con cáncer de pulmón, se recogieron datos sobre 56 condiciones de comorbilidad y se analizó el impacto de ésta en la supervivencia¹⁴¹. Sólo el 11,7% de los pacientes analizados no presentaban comorbilidad, mientras que el 54,3% presentaban 3 o más enfermedades. En cuanto a la supervivencia el estudio argumenta que tan sólo el 25,4% de la supervivencia es atribuible al estadio, mientras que el 6,1% es atribuible a la comorbilidad, el 9,2% al tratamiento y el 3,7% a la edad.

La comorbilidad tiene mayor influencia en los estadios precoces. En el análisis multivariado 19 comorbilidades se asociaron a supervivencia: VIH/SIDA, tuberculosis, cáncer metastásico previo, enfermedad tiroidea, desbalance hidroelectrolítico, anemia, otras enfermedades hematológicas, demencia, otra enfermedad neurológica, fallo cardíaco congestivo, EPOC, asma, fibrosis pulmonar, enfermedad hepática, sangrado gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedades del tejido conectivo, osteoporosis y enfermedad vascular periférica¹⁴¹.

En un estudio holandés se analizaban los 205 casos de pacientes operados de CPNCP, con el objetivo de validar la influencia del índice de Charlson. En este estudio se modificó la puntuación de la patología coronaria a un valor de 1, dado que se asocia a alto riesgo quirúrgico. Este estudio demostró que un valor del I. de Charlson de 3-4, se asociaba a un riesgo elevado de complicaciones quirúrgicas mayores, sin que en su serie encontraran asociación con factores como la edad, neumonectomía, tabaquismo, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, patología coronaria o función respiratoria. Por esto concluían que la valoración debe hacerse por este índice y no por los predictores individuales de riesgo¹⁴².

En otro estudio, que analizaba el impacto de la comorbilidad cardiovascular en los resultados quirúrgicos de los estadios precoces de cáncer de pulmón no microcítico, estadios I y II, se encontró que el 17% de 247 pacientes presentaba comorbilidad previa y que la mortalidad postoperatoria en este grupo era del 9% y la morbilidad del 58%¹⁴³.

En un estudio se analizó el tabaquismo como factor de predicción independiente para la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón y hallaron que es un factor pronóstico independiente para la supervivencia¹⁴⁴.

-SEXO

En la actualidad, el cáncer de pulmón es cuatro veces más frecuente en mujeres que hace 30 años¹⁴⁵. En Estados Unidos se diagnostican al año más de 80.000 casos en mujeres, y su mortalidad ya es superior a la del cáncer de mama, de ovario y de útero juntas¹⁴⁶.

En mujeres, el cáncer de pulmón presenta algunas características propias y diferenciales. Por ejemplo, la histología más frecuente es la de adenocarcinoma, incluso en mujeres muy fumadoras. También es de dos a cuatro veces más frecuente el carcinoma bronquioalveolar. Además, el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en mujeres que nunca han fumado es 2,5 veces superior que en los hombres. Existen muchos estudios que intentan explicar estas diferencias. Algunos de estos estudios han puesto de manifiesto que la mujer tiene mayor predisposición a los efectos carcinógenos, incluso con niveles de exposición menor¹⁴⁷. Sin embargo, otros estudios apuntan datos discordantes¹⁴⁶. Por otro lado, la presencia de mutaciones del gen EGFR es mucho mayor en mujeres¹²⁵.

La supervivencia a 5 años es del 15,6% en mujeres, frente al 12,4% en hombres. Analizando la supervivencia por estadios es superior en mujeres en todos los estadios¹⁴⁸.

En una revisión japonesa sobre 1.242 casos intervenidos de CPNM, se encontró que la resección completa era menos frecuente en mujeres (79,6 frente a 85,2%), pero cuando la resección era completa su supervivencia a 5 y 10 años era mayor¹⁴⁹.

En otra publicación, en la que revisan 4.618 casos, encuentran que ser hombre es un factor de mal pronóstico independiente¹⁵⁰.

-ESTADO GENERAL

Es el factor pronóstico más importante en la evolución de la mayoría de tumores sólidos. Se valora utilizando escalas como el índice de Karnofsky (IK) o la del grupo ECOG. Estas escalas son subjetivas. En una revisión retrospectiva de 5.000 pacientes inoperables tratados entre 1968 y 1978, se analizaron 70 variables y se encontró que el estado general valorado según el IK fue el factor pronóstico más importante para la supervivencia, seguido de la extensión de la enfermedad y la pérdida de peso en los 6 meses previos al diagnóstico¹⁵¹.

La escala utilizada en nuestra base de datos es la del grupo ECOG, que tiene 5 parámetros publicado en 1982¹⁵², que mostramos en la siguiente tabla:

GRADO	ECOG PERFORMANCE STATUS (PS)
0	Actividad completa, cumple con sus quehaceres como antes de la enfermedad, sin ninguna restricción
1	Tiene que limitar las actividades que requieren esfuerzos, pero sigue siendo ambulatorio y capaz de llevar a cabo trabajos ligeros y sedentarios
2	Ambulatorio y capaz de cuidarse, pero no de llevar a cabo cualquier trabajo. Tiene que quedarse encamado durante <50% de las horas de vigilia
3	Sólo puede cuidarse en parte. Encamado durante >50% de las horas de vigilia
4	Totalmente inválido e incapaz de cuidarse, encamado por completo
5	Muerto

Tabla 10: Clasificación ECOG del estado general y capacidad funcional del paciente¹⁵².

-PERDIDA DE PESO

En algunas series se observó que la pérdida de peso en los 6 meses previos al diagnóstico es un factor pronóstico independiente para la supervivencia^{136,151}, si bien otros autores consideran que no lo es¹⁵⁰ (30,32). En los pacientes con estadio III, si es un factor pronóstico, sobre todo para decidir planteamientos terapéuticos. Los tratamientos combinados están reservados para pacientes con una pérdida de peso mínima, ya que esta se correlaciona con la supervivencia y con el grado de toxicidad del tratamiento¹³².

-DATOS DEL LABORATORIO

Los datos que aparecen con mayor frecuencia como determinantes en los estudios son los niveles de hemoglobina (Hb) y de LDH¹⁵³.

MARCADORES MOLECULARES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

Pero incluso en pacientes con las mismas características clínicas y patológicas, la evolución varía: unos no recaen y otros si, falleciendo a consecuencia de la enfermedad.

Por otro lado, la alta tasa de recaída que presenta el cáncer de pulmón en estadios iniciales, incluso en el estadio I, ha llevado a la búsqueda de herramientas más precisas para poder distinguir qué pacientes son los que tienen más riesgo de recaída y por tanto, podrían beneficiarse más del tratamiento adyuvante.

Entre las variables pronósticas en estos estadios iniciales cabe mencionar el perfil genético tumoral. Existen estudios, en los que se determinan perfiles genéticos, que demuestran tener valor predictivo y pronóstico en CPNCP^{154,155}.

Otro marcador biológico, que ha demostrado tener valor pronóstico y predictivo de tratamiento en el CPNCP, es el gen que codifica para la RRM1, que es un componente de la ribonucleótido reductasa, enzima clave en la síntesis del DNA. Niveles altos de RRM1 y PTEN en el tejido tumoral son predictivos de mejor supervivencia global y libre de recurrencia¹⁵⁶.

Olaussen et al. en el análisis de supervivencia del estudio IALT bio, cuando se centra en el subgrupo de control, la tasa de supervivencia a 5 años era significativamente más alta en los pacientes ERCC1 positivo que entre los ERCC1 negativo⁹⁷.

Por lo tanto, ERCC1 y RRM1 son determinantes de supervivencia en estadios iniciales. En otra publicación, sobre estos marcadores moleculares, se demuestra que altos niveles de expresión de ambos, ERCC1 y RRM1 en pacientes con CPNCP tras

intervención quirúrgica, diferencian un subgrupo de pacientes con buen pronóstico^{156,157}.

Dada la complejidad de la carcinogénesis del cáncer de pulmón, sería sorprendente si un solo perfil de expresión genética pudiera describir y predecir el curso clínico de la enfermedad para todos los pacientes.

1.2 TP53

La proteína p53 está codificada por el gen TP53, localizado en el locus 17p13 y contiene 11 exones, que abarcan 20 kb. Pertenece a una familia de genes conservados, que incluyen TP63 y TP73, que codifican las proteínas P63 y P73, respectivamente¹⁵⁸. En la comparación cruzada con otras especies, p53 muestra cinco regiones altamente conservadas, en los residuos aminoacídicos 13-19, 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286. Estos cinco dominios son esenciales para la función de P53¹⁵⁹.

El gen TP53 codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos, que funciona como un factor de transcripción inducible por el daño celular.^{158,160}

Fue identificado por primera vez en 1979, formando parte de un complejo con el antígeno T SV40¹⁵⁹.

P53 contiene tres regiones funcionales distintas:

- 1- Una región ácida, N-terminal (codones 1-101).
- 2- Una región core, central de unión al ADN (codones 102-292).
- 3- Una región básica, C-terminal (codones 293-393)¹⁵⁸.

La región core o central de TP53 es la zona de unión al ADN, que consiste en una estructura β -sandwich tipo inmunoglobulina, que junto con otros elementos estructurales, forma la zona de unión¹⁶¹.

La región C-terminal o carboxi-terminal, está implicada en la tetramerización, regulación y estabilidad de la unión entre el ADN y p53^{158,162}.

p53, sólo es un factor de transcripción activo en forma homotetramérica, uniéndose al ADN^{158,161}. Como factor de transcripción, la proteína activada p53 se une a una secuencia de DNA específica, denominada elemento receptivo de p53 para regular los genes diana de p53. Este elemento receptivo se compone: RRCWWGYYY (separador de 0–21 nucleótidos)RRCWWGYYY, donde R es una purina, W es A o T, e Y es una pirimidina¹⁶³.

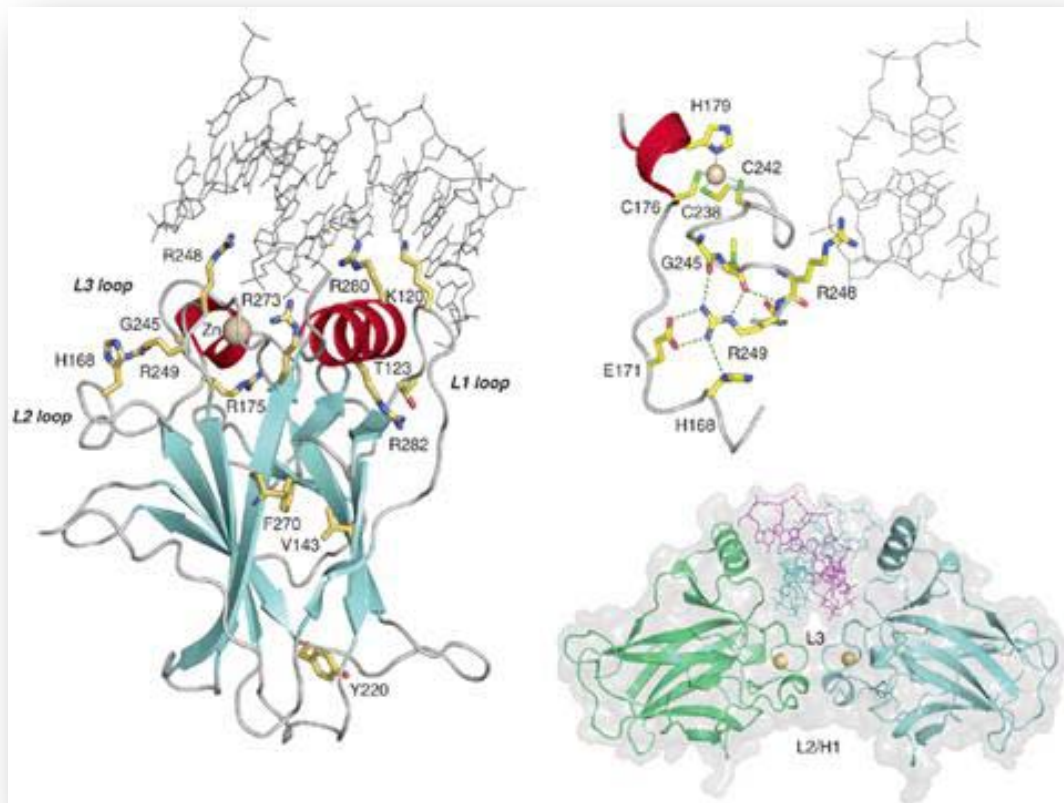


Figura 9: Estructura-función de p53: Estructura de los dominios y subdominios de p53. Se muestran puntos frecuentes de mutaciones de cáncer¹⁶¹.

El nivel de actividad de p53 en la célula no expuesta a estrés, es muy bajo. Ante el estrés celular, p53 se activa a través de una cascada de señales post-translacionales, que inducen la fosforilación de la proteína p53. Dependiendo de las condiciones del crecimiento celular, la duración del tiempo de estrés celular o de la cuantía de daño del ADN, se activan selectivamente grupos de genes que pueden causar apoptosis, arresto del crecimiento celular o reparación del ADN dañado¹⁶⁰.

p53 es conocido como “El guardián del genoma”. La respuesta de p53 al estrés comprende 3 pasos básicos, que son la estabilización de p53, la unión al ADN de forma específica de secuencia y la activación transcripcional de los genes diana.

La estabilización de p53 se consigue interrumpiendo su interacción con Mdm2, un regulador negativo de p53, que media su ubiquitinización y su degradación¹⁶⁴.

p53 regula el ciclo celular en dos puntos o *Check points*. El primero de ellos es el punto de transición entre G1-S, en respuesta a daños leves del ADN. Entre las múltiples dianas de p53, que median un arresto celular en G1, está P21WAF-1 (un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina), que condiciona una pausa suficiente para reparar el daño del ADN. Bajo un estrés más severo o extremo, p53 activa la expresión de genes implicados en la cascada celular de apoptosis, incluyendo BAX, DR5, P53AIP, PIDD, NOXA, PUMA, FAS/APO-s y otros genes relacionados con REDOX¹⁶⁰. El segundo punto es en la transición G2-M, donde tiene mayor papel GADD45 y 14-3-3¹⁵⁸.

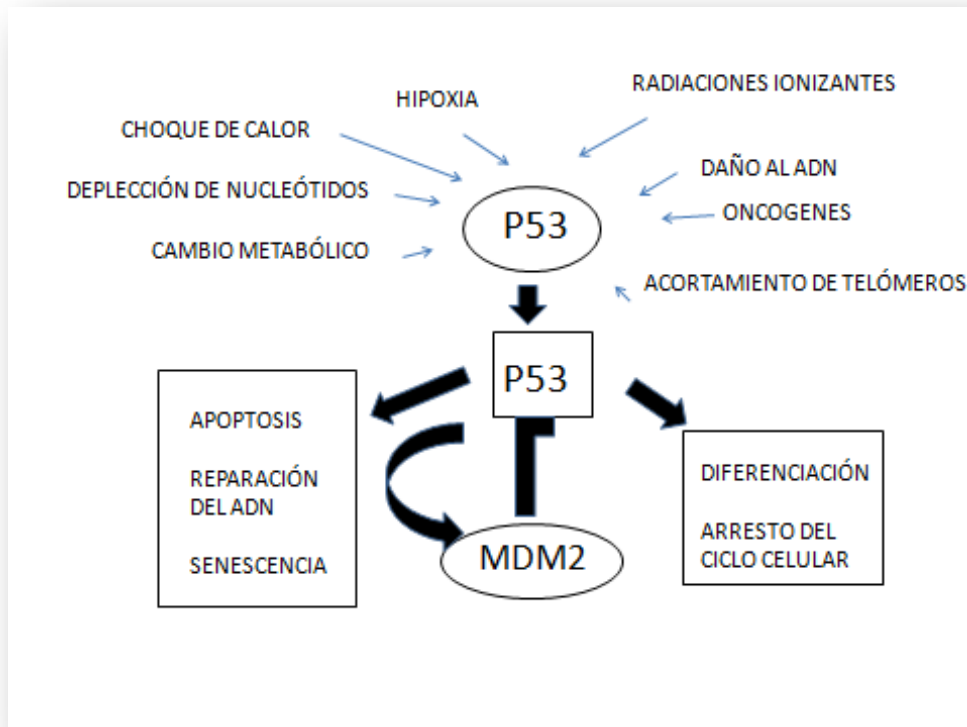


Figura 10: Esquema de activación y funciones de p53

MUTACIONES DE P53

El papel antiproliferativo de p53 en respuesta a varios tipos de estrés celular y durante el proceso de senescencia, hace de esta proteína una diana primordial. Por esto, ha sido y es de gran interés el estudio de cómo contribuyen las mutaciones de TP53 en la génesis tumoral.

La pérdida de la función normal de p53 se ha asociado a la transformación celular in vitro y al desarrollo de neoplasias in vivo¹⁵⁹.

La pérdida de sus funciones puede producirse por cambios en el gen TP53 y por formación de complejos proteicos con oncoproteínas virales.

1.- Cambios en el gen TP53 por mutaciones somáticas, germinales, pequeñas o grandes deleciones, reagrupaciones estructurales, inserciones genómicas¹⁵⁹.

La primera forma, son las mutaciones somáticas de TP53, que son frecuentes en la mayoría de los cánceres¹⁶⁵. Aproximadamente el 50% de los cánceres del adulto de colon, estómago, pulmón, esófago, mama, hígado, cerebrales y de tejidos hematopoiéticos, contienen el gen mutado. Más del 90% de las mutaciones de tipo sustitución reportadas se concentran entre los exones 5 y 8, en las localizaciones evolucionariamente conservadas¹⁵⁹. El cambio más frecuente de TP53 en los cánceres humanos es una mutación puntual en la secuencia codificante, que da lugar a una proteína alterada.

La segunda, es por la herencia de mutaciones de TP53. Se trata de mutaciones en la línea germinal, que condiciona la aparición de un síndrome autosómico dominante, que provoca la predisposición al padecimiento de cánceres de inicio temprano. Se trata del síndrome de Li-Fraumeni y del síndrome de Li-Fraumeni like. Incluyen en sus criterios diagnósticos la presencia de cáncer de mama, sarcomas, tumores cerebrales y carcinoma suprarrenal antes de los 50 años^{165,166}.

La pérdida de uno o ambos alelos en el gen reduce la concentración de p53 y por tanto reduce su función¹⁵⁹.

Otra forma de cambio en el gen, son los polimorfismos. TP53 es un gen muy polimórfico, en sus regiones codificantes y no codificantes, y algunos de esos polimorfismos se han relacionado con susceptibilidad a padecer cáncer¹⁶⁵.

La zona de unión del ADN de TP53 es un “hot spot” para las mutaciones, dándose la mayoría de las mutaciones asociadas a tumores en esta región^{164,167}.

Alrededor del 55% de los cánceres de pulmón contienen mutaciones de TP53, la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales entre los exones 5 y 8^{168,169}.

Las mutaciones denominadas *nonsense* dan lugar a una proteína truncada. Lo más frecuente es que exista una mutación *missense* y una delección en el otro alelo, lo que resulta en la ausencia de proteína p53 salvaje¹⁵⁹.

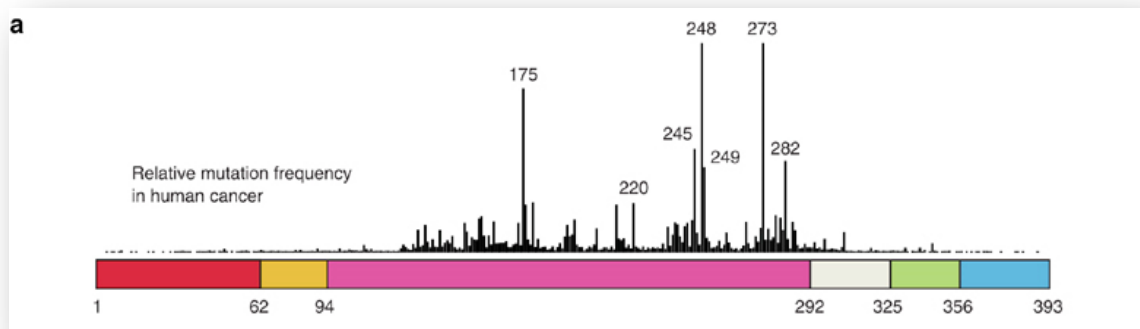


Figura 11: Estructura-función de TP53: En esta figura se muestra la distribución por frecuencia de las mutaciones comunes de TP53 en los cánceres humanos¹⁶¹.

2.- Formación de complejos proteicos con oncoproteínas virales, como por ejemplo SV40-T antígeno, adenovirus E1B, la proteína E6 del virus del papiloma, el antígeno del virus de la hepatitis B, el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr o con productos genéticos celulares como Mdm2. La unión de la proteína E6 y de P53, resulta en una degradación acelerada de p53¹⁵⁹. Al igual la unión de Mdm2 y p53 provoca su degradación^{159,164}.

En CPNCP, varios estudios han valorado el estado mutacional de TP53 como un factor pronóstico, con resultados controvertidos. En algunos casos la sobreexpresión de p53 se ha relacionado con peor supervivencia en estadios iniciales de CPNCP^{170,171,172,173}, en otros casos se concluye que una vez desarrollado el tumor, el papel de p53 es importante, pero no una variable pronóstica¹⁷⁴ y en otros casos, se ha relacionado la alta expresión de p53 con mejor pronóstico^{175,176}. En una revisión sistemática con meta-análisis de estudios, que relacionan p53 con supervivencia en cáncer de pulmón no célula pequeña, se concluye que el estado anormal de p53 es un factor que implica peor supervivencia¹⁷⁷.

1.3 MICRORNAs

GENERALIDADES

Los microRNAs (miRNAs) son unas pequeñas moléculas de RNA endógeno, que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Juegan un papel regulador muy importante en animales y plantas, uniéndose a los RNA mensajeros (mRNA), inhibiendo su traducción a proteína.

Los miRNAs fueron descubiertos como pequeños RNAs temporales, que regulaban la transición de las fases del desarrollo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El primer microRNA fue Lin-4, descubierto en *C. elegans* por defectos en su control temporal del desarrollo postembrionario.

Lin-4 codifica un RNA no codificante para proteína de 22 nucleótidos, complementarios a la secuencia de la región 3'UTR (*untranslated-region*) del RNA mensajero de la proteína LIN-14^{178,179}. El descubrimiento de Lin-4 y la diana de la que inhibe la traducción de forma específica, puso de manifiesto un nuevo mecanismo de regulación genética durante el desarrollo. A partir de lin-4 se intentaron encontrar miRNAs homólogos en otras especies, pero no se encontró nada. No fue hasta 7 años después, que con el descubrimiento del segundo miRNA, let-7, se empezaron a descubrir homólogos en múltiples especies.

Cientos de miRNAs han sido descritos hasta la actualidad, en varios organismos. Se trata de estructuras evolutivamente conservadas, que tiene un papel en la regulación del desarrollo. Actualmente en humanos se conocen 891 miRNAs (www.mirbase.org).

Estos miRNAs son RNAs no codificantes (ncRNA) de proteína de 21-25 nucleótidos (en su forma madura), que se derivan de precursores más grandes que forman unas estructuras *stem-loop*. Los precursores son procesados por dos ribonucleasas antes de llegar a ser un miRNA maduro.

En los animales, los miRNAs se unen al extremo 3'UTR de su RNA mensajero diana, con complementariedad imperfecta y funcionan como represores de la traducción de proteínas, en general.

Aunque todavía no se conoce muy bien, parece que también los ncRNAs son piezas fundamentales en control de genes, estando implicados no sólo en una regulación post-transcripcional de la expresión genética, si no que tienen un papel en la

regulación transcripcional de los genes, fenómenos epigenéticos, integridad del genoma¹⁸⁰.

A la vez que se descubrían los miRNAs, otros RNAs pequeños se caracterizaban como componentes de un proceso biológico separado, la RNA interferencia (RNAi)¹⁷⁹. Pero cada vez se van conociendo más formas no codificantes de RNA, tanto de cadena corta como de cadena larga, con diferentes funciones, no todas bien conocidas. Por tanto, los miRNAs forman parte de una gran familia de ncRNAs, con capacidad reguladora de la expresión genética, de la que estamos empezando a conocer cada vez más¹⁸¹.

En las siguientes tablas, muestro un resumen de las clases de ncRNA conocidas hasta ahora¹⁸¹.

CLASES DE RNA NO CODIFICANTE (NcRNA) (I)	CARACTERÍSTICAS (I)
Long(regulatory) non-coding RNAs (lncRNAs)	El grupo más extenso. lncRNA engloban todos los RNAs no codificantes de proteína, tanto los de cadena larga como corta. Sus funciones incluyen regulación epigenética, actúa como cadena secuencia específica para complejos proteicos y especificando el compartimento subcelular o localización.
Small interfering RNAs (siRNAs)	RNAs pequeños de 21-22 nucleótidos (nt) de longitud, producidos por el procesamiento de Dicer de las dsRNA dúplex complementarios. siRNAs forman complejos con las proteínas Argonata y están envueltos en la regulación genética, control de transposones y defensa viral.
miRNAs	RNAs pequeños de 21-22 nt de longitud producidos por el procesamiento de Dicer de los hairpin de RNA de complementariedad imperfecta codificadas en largos transcritos primarios o intrones cortos. Se asocian a las proteínas Argonata y están principalmente envueltas en la regulación genética post-transcripcional.
PIWI-interacting RNAs (piRNAs)	Pequeños RNAs independientes de Dicer de 26-30 nt, restringidos a las células germinales y a las somáticas que lindan con las germinales. Se asocian con las proteínas Argonautas PIWI-clade y regulan la actividad de los transposones y el estado de la cromatina.
Promoter-associated RNAs(PARs)	Término general que engloba a RNAs largos y cortos; incluyen RNAs asociados al promotor y a RNAs de iniciación de la transcripción (tiRNAs), que se solapan con los promotores. Estos RNAs pueden regular la expresión genética.
Small nucleolar RNAs (snoRNAs)	Tradicionalmente vistos como guías de la metilación de rRNA y de la pseudo uridilación. Sin embargo, hay evidencia de que también tienen papel en la regulación genética.

Tabla 11: Clases de RNA no codificante (I).

CLASES DE RNA NO CODIFICANTE (NcrNA) (II)	CARACTERÍSTICAS (II)
X-inactivation RNAs (xiRNAs)	Pequeños RNAs dependientes de Dicer procesados de los dúplex de dos lncRNAs, Xist y Tsix, que es responsable de la inactivación del cromosoma -X en la placenta de mamíferos.
Sno-derived RNAs(sdRNAs)	Pequeños RNAs, algunos son Dicer dependiente, que son procesados desde los pequeños RNA nucleolares (snoRNAs). Algunos sdRNAs han mostrado funcionar como miRNAs reguladores de la traducción.
miRNA-offset RNAs (moRNAs)	Pequeños RNAs de 20nt de longitud, derivados de regiones adyacentes a los pre-miRNAs. Función desconocida.
tRNA-derived RNAs	tRNAs pueden ser procesados en especies de pequeños RNAs mediante una RNasa. Son capaces de inducir represión traduccional.
MSY2-associated RNAs (MSY-RNAs)	MSY-RNA están asociados con la proteína de unión a DNA/RNA específica de célula germinal MSY2. Como los piRNAs están restringidos a la línea germinal y son de 26-30 nt de largo. Función desconocida.
Telomere small RNAs (tel-sRNAs)	RNA de 24 nt Dicer independiente derivado de las cadenas teloméricas ricas en G. Puede tener papel en el mantenimiento de los telómeros.
Centrosome-associated RNAs(craSiRNA)	Pequeños RNAs de 34-42 nt, derivados de los centrosomas, con evidencia de guiar modificaciones de la cromatina locales.

Tabla 12: Clases de RNA no codificante (II).

En la siguiente figura se muestra un resumen de las funciones de los RNA no codificantes a nivel epigenético, transcripcional, post-transcripcional, de integridad del genoma y en la defensa contra virus y transposones.

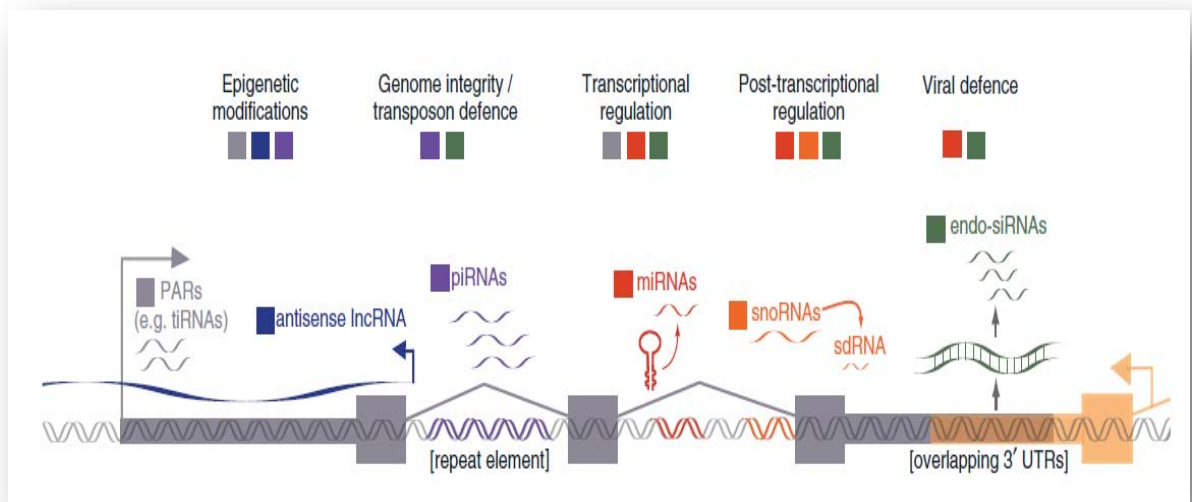


Figura 12: Funciones de los RNA no codificantes¹⁸¹.

RNA interferencia

La RNAi es un mecanismo evolutivamente conservado de silenciamiento de genes de forma específica por complementariedad de secuencia de nucleótidos. Se induce por exposición a RNAs de doble cadena -*dsRNA: double stranded RNA*-.

En muchos sistemas, incluido el de gusanos, plantas y moscas, el estímulo que inicia una RNA interferencia es la introducción de un dsRNA de 500 pares de bases (pb). Este dsRNA se procesa en pequeños dsRNA de 21-25 pb, que se designan *small interfering RNA* (siRNA). Una de las cadenas de los siRNA, se incorpora selectivamente al complejo efector de RISC, *RNA-induced silencing complex*. RISC directamente destruye el RNA mensajero diana.

Este mecanismo de la RNAi, que responde a dsRNA exógenos refleja un mecanismo endógeno de defensa contra infección vírica o ácidos nucleicos parásitos.

La diferenciación entre miRNAs y siRNAs refleja las vías diferentes de descubrimiento de estos RNAs, puesto que son similares en términos de características moleculares, biogénesis y funciones.

Lo que sí ha puesto de manifiesto la distinción entre siRNA y miRNA, es que el grado de complementariedad entre el siRNA/miRNA y su diana, puede determinar el mecanismo de silenciamiento. Cuando la complementariedad de la unión es perfecta, se produce la destrucción y la degradación del RNA mensajero, como ocurre en el caso de los siRNA. En cambio, cuando la unión es imperfecta, se consigue una represión de la traducción más que una destrucción del RNA mensajero. Esta es la diferencia más importante entre los siRNAs y los miRNAs. El mecanismo de represión de la traducción por complementariedad perfecta es muy rara en humanos, siendo la más habitual la mediada por miRNAs¹⁷⁹.

BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados principalmente dentro de los intrones de genes que pueden codificar para proteínas(90%), así como también en regiones intergénicas o exónicas¹⁸². Algunos miRNA primarios constituyen su propia unidad transcripcional, con una estructura precursora mono o policistrónica, mientras que otros miRNAs residen en intrones, exones o regiones intergénicas de la proteína codificante que regulan¹⁸³. La distribución de estos, no es al azar, ya que parece que los ncRNA, son capaces de regular a los genes en los que reside y a los de las regiones vecinas¹⁸⁰

Los miRNAs maduros son moléculas de unos 20-25 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Para realizar su función, precisan de un procesamiento que se inicia en el núcleo celular y que se completa en el citoplasma, donde realizan su función. Son transcritos por la RNA polimerasa II, que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1 Kb, que se conoce como miRNA primario o pri-miRNAs¹⁸². Los pri-miRNAs, son modificados postranscripcionalmente, añadiéndoles un cabezal m⁷G en el extremo 5' y una estructura poli-A en el extremo 3'¹⁸³. Este forma una estructura en horquilla tallo-bucle (*hairpin stem-loop*), que es cortada en el núcleo por la endonucleasa RNAasa III, conocida con el nombre de Drosha, que está asociada con la proteína DGCR8 en los mamíferos o Pasha en *Drosophila* y en *C. elegans*. Drosha corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de stem-loop¹⁸². Como resultado se obtiene una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada pre-miRNA. Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP Exportina-5. Ran es un cofactor que une GTP durante la exportación de RNA desde el núcleo al citoplasma¹⁸². Una vez en el citoplasma, esta molécula de 70 nucleótidos será cortada por la endonucleasa RNAasa III conocida como Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos. Esto da lugar a una molécula de doble cadena conocida como miRNA dúplex.

De éste miRNA dúplex, se separaran las dos cadenas, mediante una helicasa y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nucleótidos. El miRNA maduro se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como RISC¹⁸³. Este complejo es la maquinaria catalítica que se encarga de degradar el mRNA o de la inhibición de la

traducción del mRNA¹⁸². Si la unión se produce entre la cadena guía de un siRNA, el complejo RISC, se denomina siRISC, en cambio si se trata de un miRNA, el complejo se denomina miRISC¹⁸⁴.

El complejo RISC contiene las proteínas Argonauta 1 y 2 (Ago 1 y Ago 2). Ago 2 cataliza el clivaje de los mRNAs diana, en los casos de complementariedad perfecta o reprime su traducción, en los casos de complementariedad imperfecta, mediante RISC, y los confina a los cuerpos de procesamiento citoplasmático (*processing bodies: p-bodies*). Otro componente de RISC es RCK/p54, una helicasa, que interacciona con Ago 1 y Ago 2 *in vivo*, facilitando la formación de los *p-bodies* y la represión de la traducción del mRNA diana. La depleción de RCK/p54 altera los *p-bodies* y dispersa Ago 2 en el citoplasma, pero no afecta la función de RISC^{184,185}.

Múltiples copias del complejo RISC que contengan RCK/p54, pueden iniciar eventos de oligomerización, secuestrando el mRNA en los *p-bodies*.

El mRNA traduccionalmente reprimido podría permanecer en los *p-bodies* para su almacenamiento o degradación¹⁸⁵.

Después de ejercer su función, ya sea la degradación del mRNA o la inhibición de su traducción, el miRNA permanece intacto y puede guiar hacia el reconocimiento de otros mRNA¹⁸⁵.

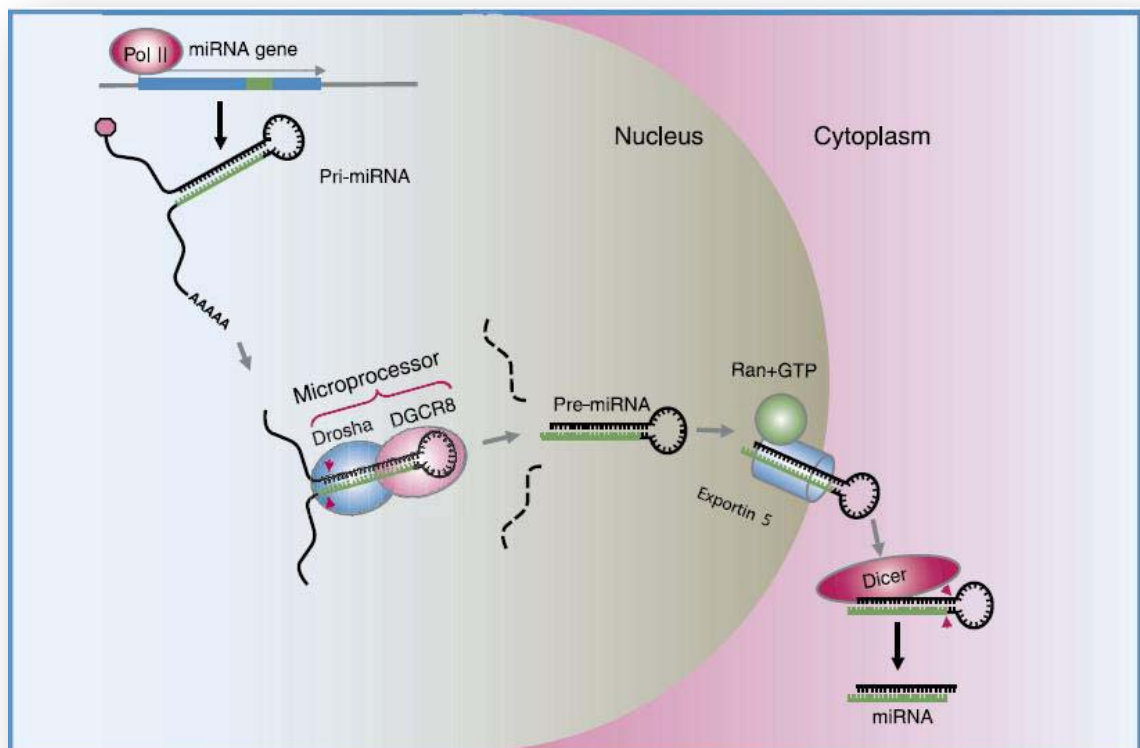


Figura 13: Modelo de biogénesis de los miRNAs¹⁸².

El mecanismo preciso mediante el que el miRNA se une a su mRNA no está totalmente claro, pero sí algunas características. La secuencia de unión del miRNA está situada en la región 3' UTR del transcrito, entre la región codificante de la proteína del mRNA y su cola poli-A¹⁸³.

Mediante la comparación de secuencias de los miRNAs y sus mRNAs diana, se ha encontrado que existe una región semilla (*seed region*), desde los nucleótidos 2 a 8, que se une de forma complementaria a la secuencia reconocida del mRNA.

La zona central del miRNA habitualmente no tiene complementariedad con el mRNA, mientras que la región 3' del miRNA se une más o menos específicamente al mRNA y contribuye a la mayor especificidad y afinidad del complejo mRNA-miRNA¹⁸³.

Cuando la *seed region* no muestra una complementariedad completa con la secuencia de unión del mRNA diana, se requiere, para la estabilidad del complejo, una unión fuerte de la región 3' con el mRNA.

Los miRNAs que muestra una unión fuerte, pueden ejecutar su función por ellos mismos, pero cuando la unión es más débil, a menudo, tienen que actuar conjuntamente con otros miRNAs, que se unen al mismo mRNA¹⁸³.

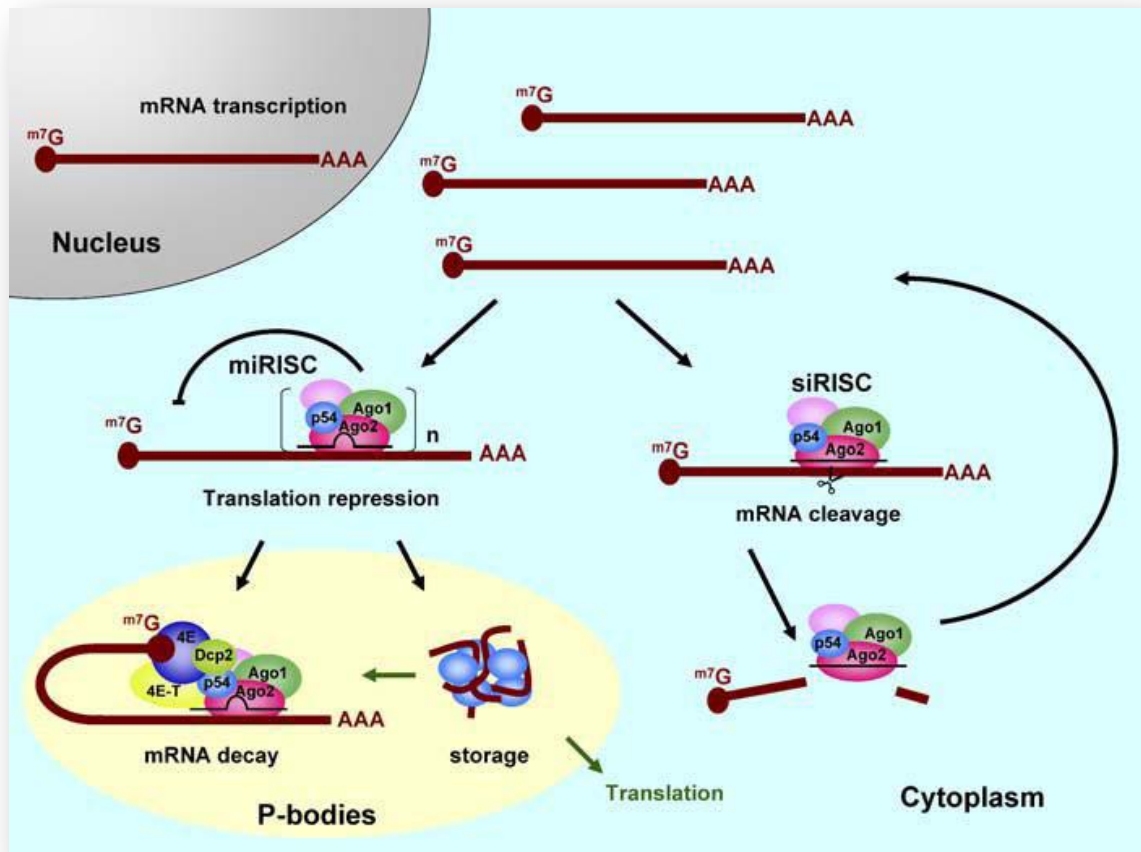


Figura 14: Modelo de funcionamiento del complejo RISC.¹⁸⁵.

ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LOS miRNAs

Puede darse una alteración de la regulación directa de los miRNAs. Un miRNA puede regular más de 100 mRNAs diferentes, por lo que alteraciones en sus niveles de expresión, procesamiento de sus precursores o mutaciones en su secuencia, en la de sus precursores o en su mRNA diana, pueden alterar sus efectos en la fisiología celular.

Estas alteraciones pueden ser categorizadas en los siguientes tipos:

1. Alteraciones de los niveles de expresión de los miRNAs.

- En grandes alteraciones genómicas, como deleciones, inserciones, inversiones y translocaciones.
- Regulaciones epigenéticas en el gen del miRNA.
- Mutaciones puntuales en la región promotora del gen del miRNA o en la región codificante.

2. Alteraciones que afectan al procesamiento del miRNA.

- Mutaciones/polimorfismos en el pri-miRNA o en el pre-miRNA, pueden afectar a los niveles finales de miRNA maduro.
- Alteraciones en las moléculas que intervienen en el proceso de biogénesis.

3. Mutaciones en las secuencias de interacción miRNA:mRNA. Estas mutaciones pueden debilitar la interacción entre miRNA y mRNA, en especial cuando se dan en la *seed region*¹⁸³.

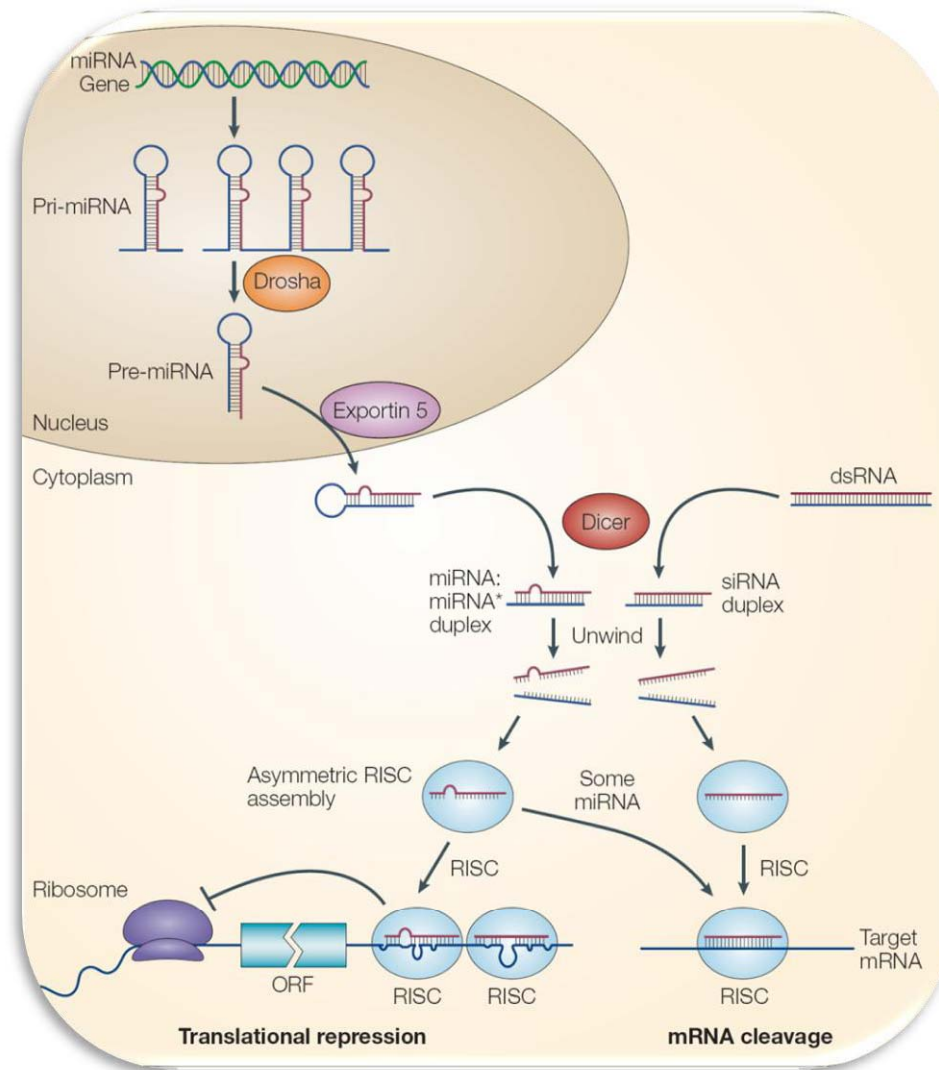


Figura 15: Regulación postranscripcional por miRNAs y siRNAs¹⁷⁹.

MICRORNAS COMO ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

Los diferentes perfiles de expresión de miRNAs en tipos celulares y tejidos, indica que la forma de expresión de los miRNAs es específica de tipo celular y de tejido, lo que sugiere que el programa de expresión de miRNAs es dependiente del tipo celular y asociada con su diferenciación y desarrollo¹⁷⁸.

Hay evidencia de que la expresión de miRNAs está alterada en cáncer y que ciertos cambios están directamente implicados en el proceso de carcinogénesis. Algunos miRNAs se han asociado a la promoción de la proliferación celular y la supervivencia, mientras que otros las disminuyen. Estas dos clases de miRNAs pueden tener un papel

en el desarrollo del cáncer como nuevos oncogenes y supresores de tumores. En general, la mayoría de los miRNAs están disminuidos en las muestras tumorales¹⁸³.

Uno de los primeros indicios de que los miRNAs estaban ligados a proceso tumoral fue la conexión entre miR-15 y miR-16 con la delección de 30 Kb en la región 13q14, que se pierde hasta en el 68% de los casos de leucemia linfática crónica (LLC).

El estudio comparativo entre la LLC de curso indolente y la agresiva, mostró un perfil de 13 miRNAs, que distinguían entre la LLC de buen y mal pronóstico. La secuenciación de los miRNAs de esta firma, permitió identificar las mutaciones germinales y somáticas de los genes de los miRNAs miR-15 y miR-16-1¹⁸⁶. La presencia de mutaciones se observó en las células de leucemia homocigotas, mientras que las células normales de los pacientes eran heterocigotas. Por tanto, estos dos miRNAs se comportan como típicos supresores de tumores en la LLC. Utilizando diferentes algoritmos para identificar las dianas de estos miRNAs, validaron Bcl-2 como target, un oncogen que protege a las células de la apoptosis. Indirectamente, también se asociaron con la proteína mcl-1, otra proteína relacionada con la apoptosis y Bcl-2^{178,187}.

Por tanto, la función como tumor supresor de un miRNA (TS-miRs) se da cuando la proteína que controla es una oncoproteína, y el miRNA se expresa e inhibe la traducción de la oncoproteína. En cambio, la función como oncogén de un miRNA (oncomiRs), se da cuando el miRNA controla la expresión una proteína supresora de tumores y este miRNA se expresa y la traducción del supresor de tumores se inhibe¹⁸⁸.

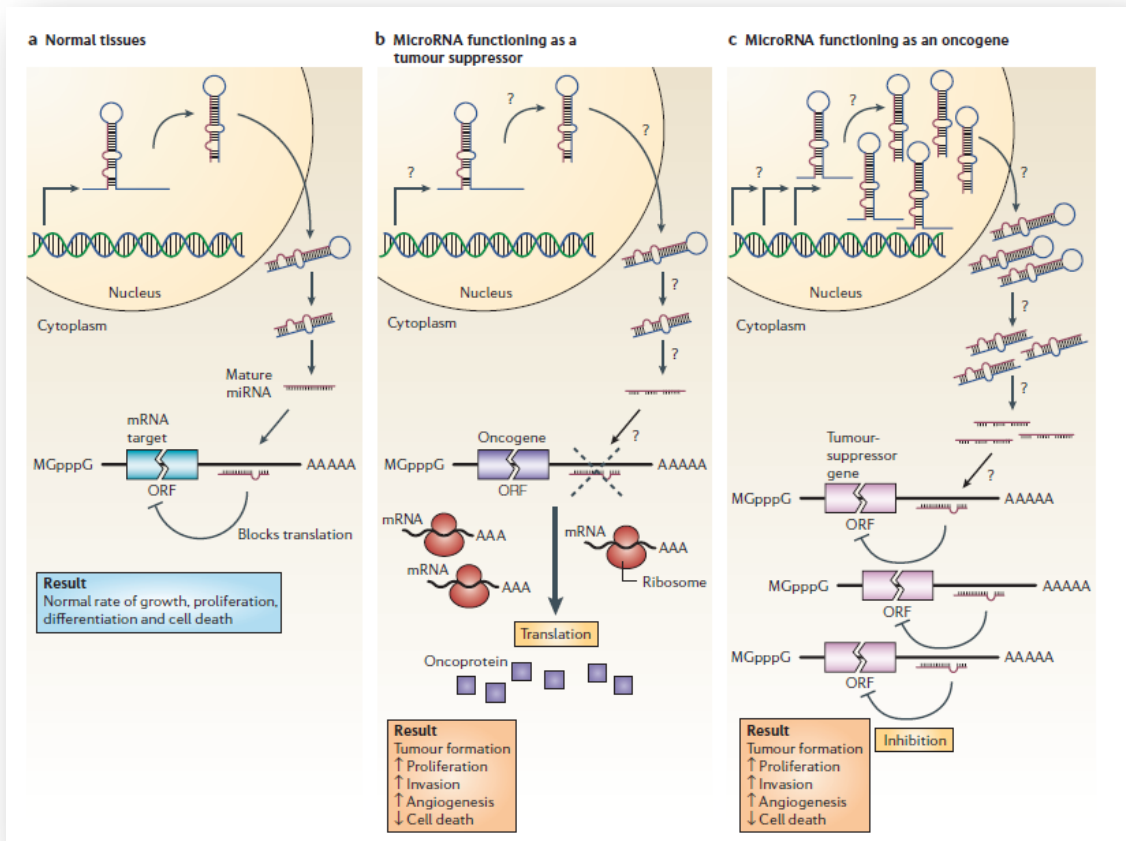


Figura 16: miRNAs pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes¹⁸⁸.

TS-miRs

Además de miR-15 y miR-16, hay otros miRs que están disminuídos en las células tumorales. Por ejemplo, son casos miR-143 y miR-145 en el cáncer colorrectal; miR-145 en el cáncer de mama, let-7 en el cáncer de pulmón; miR-29-b en la LLC y en la leucemia mieloide aguda (LMA)¹⁸³.

ONCOMiRs

Algunos miRNAs conocidos como oncogenes son miR-155, miR-21, los miembros del cluster miR-17-92.

miR-155 está aumentado en linfomas de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico y en linfoma de Hodgkin. Este miRNA está codificado en la porción terminal del gen BIC (B-cell integration cluster). Parece estar relacionado con la inflamación, inmunidad y cáncer. También se ha relacionado con mal pronóstico en cáncer de pulmón¹⁸³.

Otro policistrón conocido por su función de oncogén es miR-17-92. Este cluster, que incluyen 7 de miRNAs se ha relacionado con el oncogén MYC¹⁷⁸. Lo conforman miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-19b-1, miR-20 y miR-92, que se codifican en el locus 13q31.3, frecuentemente amplificado. miR-17-5p y miR-20 regulan la traducción de E2F1, un conocido factor de transcripción nuclear¹⁸³.

En cáncer de mama la sobreexpresión de miR-21 se relaciona con supervivencia y proliferación celular, que regula los genes supresores PTEN, PDCD4 y TPM1. También está sobreexpresado en glioblastoma, ovario, pulmón. En cáncer de colon y páncreas se ha relacionado con pobre supervivencia y poca respuesta a los tratamientos¹⁷⁸.

En la siguiente tabla, algunos de los miRNAs más importantes relacionados con cáncer¹⁸⁸:

miRNA	Loci del gen	Asociación con cáncer	Función
miR-15a, miR-16-1	Cromosoma 13q14	Delecionado o infrarregulado en LLC B; regulación negativa del gen BCL-2	TS
miR-143, miR-145	Cromosoma 5q32-33	Disminuido en CCR; infrarregulado en CM, próstata, cérvix y linfoide: miR-145 está disminuido en CM.	TS
miR-21	Cromosoma 17q23.2	Factor anti-apoptótico, suprarregulados en GBM y CM.	OG
Familia let-7	Múltiples loci	Regulación negativa del oncogen RAS. Disminuido en CP	TS
BIC/miR-155	Cromosoma 21q21	Suprarregulado en linfoma de burkitt, Hogdkin, primario mediastínico y difuso de células B y en CM.	OG
Cluster miR-17-92	Cromosoma 13q31-32	Suprarregulado por MYC; Modula negativamente al oncogen E2F1; LOH en hepatocarcinoma; sobreexpresado en linfomas B.	TS/OG

Tabla 13: miRNAs importantes asociados con cáncer.

PRINCIPALES MICRORNAS EN CÁNCER DE PULMÓN

El estudio de las alteraciones de los miRNAs en cáncer de pulmón ha suscitado un gran interés y existen importantes hallazgos.

En cáncer de pulmón hay perfiles de diagnóstico y pronóstico de miRNAs. Este es el caso del estudio de Yanaihara, en el que mediante el análisis de microarrays se identificaron perfiles únicos que discriminan tejido pulmonar tumoral del no tumoral, e incluso distinguir entre las histologías de los diferentes tumores.

Además, en este estudio, se objetivó que la expresión elevada de miR-155 y baja de let-7a-2 en tejido tumoral de adenocarcinoma, se correlacionaba con una pobre supervivencia, en el análisis univariado, así como sucede en el análisis multivariado, con miR-155. Estos resultados se confirmaron realizando estudios de RT-PCR y la validación de los datos en una serie de independiente de adenocarcinomas¹⁸⁹.

Recientemente, se ha publicado una firma de miRNAs detectados en sangre de los pacientes con adenocarcinoma o carcinoma epidermoide de pulmón en estadio I-IIIa, tratados con cirugía y quimioterapia adyuvante, que se ha relacionado con supervivencia. En este estudio se detectaron alteraciones en los niveles de 11 miRNAs, de hasta 5 veces, entre las muestras de pacientes de mayor y menor supervivencia. Entre estos 11 miRNAs, 4 se asociaron significativamente con supervivencia global. Estos miRNAs son miR-486, miR-30d, miR-1 y miR-499¹⁹⁰.

Takamizawa llevó a cabo un estudio con el tejido tumoral de pacientes con CPNCP tras cirugías potencialmente curativas, que demostró que los niveles de let-7 estratificaban a los pacientes en dos grupos, siendo los pacientes con niveles bajos los que mostraban menores supervivencias. En la segunda parte de este estudio, con líneas celulares de CPNCP, al sobreexpresar let-7, el crecimiento celular *in vitro*, quedaba inhibido¹⁹¹.

Fue Johnson, quien identificó las dianas de la familia de let-7, basándose en experimentos con tejidos de *C. elegans* y de dos líneas celulares humanas, utilizando un sistema basado en la pantalla computerizada (*based-computed screen*), para identificar genes codificantes de mRNA, que contuvieran los múltiples sitios complementarios con la región 3'UTR de let-7, dirigiéndose a cuatro genes: el gen RAS del nematodo (que se denomina let-60) y los genes humanos KRAS, HRAS y NRAS.

Después los autores investigaron el papel de let-7 en el contexto del cáncer, por la relación entre la vía de señalización celular que activa la proteína RAS y cáncer. Se basaron en el uso de 2 líneas celulares diferentes, obteniendo mayor evidencia de su interacción, ya que la sobreexpresión de let-7 reprimía la expresión de RAS¹⁹².

Existe otro estudio, que evalúa el uso de perfiles de expresión de miRNAs, como herramienta para predecir la recaída del CPNCP estadio I, tras cirugía. Concluyen que entre todos los miRNAs evaluados, los niveles de miR-488, miR-503 y miR-647, pueden ser la mejor referencia para ser utilizados en este tipo de estudios en tejido de CPNCP¹⁹³.

Cabe destacar, otro estudio que relaciona miR-15 y miR-16, con el CPNCP. Estos miRNAs, que están implicados en el control del ciclo celular, están delecionados o infraexpresados en el carcinoma escamoso y en el adenocarcinoma de pulmón. miR-15 y miR-16, indican arresto del ciclo celular en G0-G1, en las células de CPNCP de una forma dependiente de la proteína del retinoblastoma(Rb)¹⁹⁴.

Por otro lado, alteraciones en el procesamiento de los miRNAs pueden ser causa también de tumores. En este caso, cabe destacar el estudio de Karube, en el que se relacionaron los niveles reducidos de la nucleasa Dicer, con la supervivencia de pacientes con CPNCP tratados quirúrgicamente. En el análisis multivariado los niveles de expresión de Dicer eran un factor pronóstico independiente del estadio y los pacientes con tumores pobremente diferenciados eran los que mostraron más alta incidencia de niveles bajos de Dicer, de forma significativa¹⁹⁵.

MICRORNAs y P53

Existe una fuerte evidencia de que los niveles de expresión celular de los miRNAs de la familia de miR-34, está directamente regulada por p53, en respuesta al daño al DNA¹⁹⁶. En los mamíferos la familia miR-34, comprende tres miRNAs procesados, que se codifican en dos genes diferentes: miR-34a, que se codifica en su propio transcrito, en el cromosoma 1p36, mientras que miR-34b y miR-34c comparten el mismo transcrito primario, en el cromosoma 11q23¹⁹⁷.

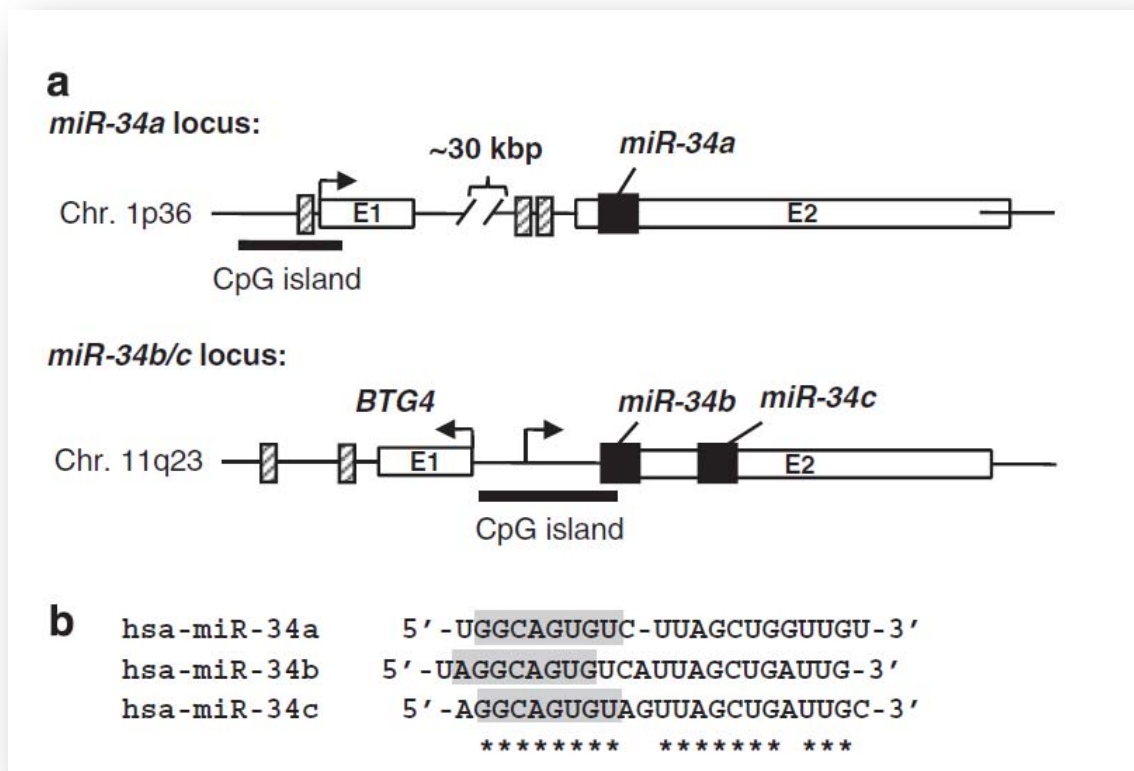


Figura 17: a. Estructura genómica de los loci de los genes de la familia miR-34. **b.** Secuencias de alineamiento de los miRNAs maduros de la familia miR-34 y remarcadas las *seed regions*¹⁹⁷.

Existe evidencia de que miR-34a se comporta como un supresor tumoral en las células de los neuroblastomas¹⁹⁸ y en las de cáncer de páncreas¹⁹⁹.

Los genes de la familia de miR-34, presumiblemente tienen funciones específicas por tejido, siendo este hecho derivado de que no se expresan por igual en todos los tejidos.

La expresión ectópica de los genes de miR-34, tuvo efectos drásticos en la proliferación y supervivencia celular. miR-34a y miR-34b/c ectópicos causaban arresto del ciclo celular en la fase G1. Además la re-expresión de miR-34a, induce apoptosis^{197,200}.

El análisis de microarrays después de la introducción ectópica de diferentes miembros de la familia de miR-34, en varias líneas celulares, reveló cientos de dianas putativas, que estaban infraexpresadas^{197,200,201}.

Los mRNAs con funciones en el control del ciclo celular y de la respuesta al daño del DNA, parecían sobrerrepresentados entre los transcritos reducidos por miR-34a.

Además estos mRNA infraexpresados mostraban en sus 3'UTR, secuencias ricas en complementariedad a la *seed region* de unión a miR-34. Algunos ejemplos incluyen a CDK4/6, Ciclina E2, MET, SIRT1 y BCL2^{196,197,202}.

La gran similitud entre los tres miRNAs, sugiere que tienen las mismas dianas¹⁹⁷.

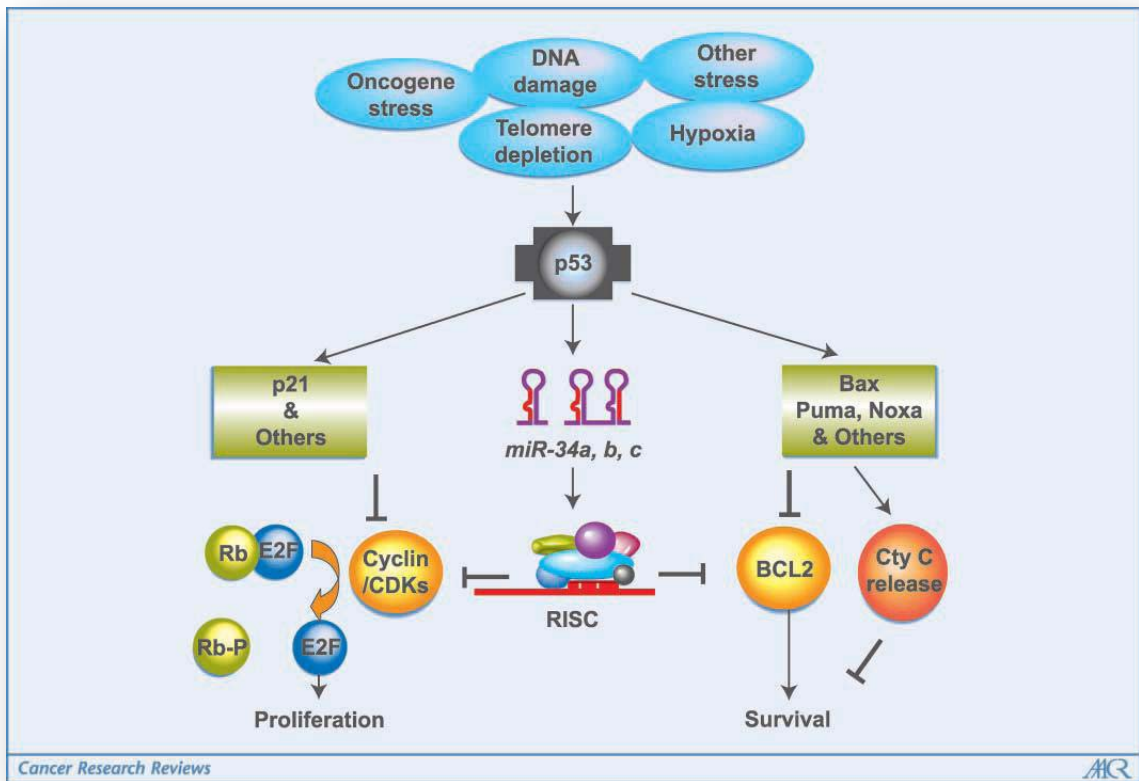


Figura 18: Red de P53 y la familia de microRNAs miR-34²⁰³.

La inducción de los genes de miR-34, permite a p53 la regulación de la expresión de un gran número de proteínas, incluso después de haber sido sintetizadas.

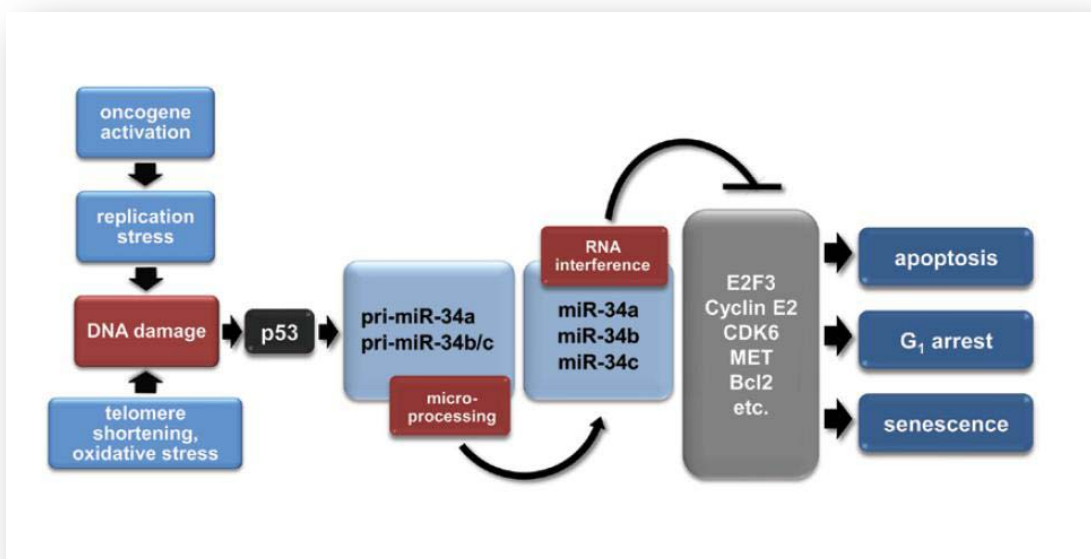


Figura 19: La familia miR-34 como mediador de la supresión tumoral por P53²⁰⁴

Por tanto, miR-34a, se comportan como un gen supresor de tumores, dado que regula negativamente la expresión de proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular y funciones antiapoptóticas.

Pero aunque la expresión de miR-34a es dependiente de p53, también se puede ver influida por otras formas de silenciamiento transcripcional, a nivel epigenético.

Aproximadamente el 60% de todos los genes tienen islas CpG en su región promotora y la metilación de estas provoca la inactivación de genes supresores de tumores clave.

Además existe evidencia de que la inactivación del gen de miR-34a mediante la metilación de CpG de su región promotora, es un evento frecuente en un amplio rango de tumores²⁰¹.

Otros miRNAs, cuya expresión se ha relacionado con P53, son miR-16, miR-143 y miR-145, tras daño celular²⁰⁵.

P53 estimula la maduración post-transcripcional de miR-16, miR-143 y miR-145, interaccionado con el complejo que Drosha, a través de su asociación con la helicasa p68 y facilita el procesamiento de sus pri-miRNAs²⁰⁵

Algunas mutaciones en el gen de p53, como la R175H y la R273H, que se observan frecuentemente en los tumores, pueden llevar a descenso del procesamiento de los pri-miRNAs por Drosha y disminuir los niveles de los pri-miRNAs y de los miRNAs maduros en las células, incluyendo estos miRNAs (miR-16, miR-143 y miR-145)²⁰⁶.

Por otro lado, miR-16, del que ya hemos comentado su papel como supresor de tumores, conjuntamente con miR-15 y en relación a la LLC, también es inducido, inmediatamente tras el daño celular y regula negativamente a WIP1 (Wild type p53-induced phosphatase 1), que se ha identificado como un oncogén. Se trata de una fosfatasa, cuya función es inhibir la vía de señalización de p53 tras el daño del DNA²⁰⁷.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El cáncer de pulmón no célula pequeña es la neoplasia más frecuente en la actualidad en los países industrializados, siendo la primera causa de mortalidad por cáncer en el varón. Su incidencia continúa aumentando progresivamente, y su tratamiento, pese a los esfuerzos de investigación de los últimos años, sigue siendo poco efectivo en la mayor parte de los casos, situándose la supervivencia global a los cinco años alrededor del 13%.

La alta tasa de recaída, incluso en estadios iniciales susceptibles de cirugías radicales, justifica el interés de estudiar marcadores pronósticos de supervivencia y recaída. Esto nos ayudaría a distinguir grupos de riesgo, cuyo interés radica en ayudarnos a conocer la necesidad y efecto de los tratamientos adyuvantes, con quimioterapia y radioterapia así como abrir la puerta a posibles nuevas armas terapéuticas.

Dada la alta incidencia de alteraciones en la vía de p53 en el cáncer de pulmón no célula pequeña, y su probable valor pronóstico, se trata de establecer la existencia de alteraciones en los niveles de expresión de los miRNAs directamente regulados por p53, como reguladores intermedios de la función de p53, con posible valor pronóstico en recaída y supervivencia de pacientes operados de CPNCP.

OBJETIVOS

Basándonos en las hipótesis que acabamos de plantear, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

OBJETIVOS GENERALES:

Identificar el papel que juegan los miRNAs como marcadores útiles en el pronóstico del CPNCP en estadios iniciales, tras cirugía radical.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el posible papel pronóstico en recaída y en supervivencia de los miRNAs de la familia de miR-34: miR-34a, miR-34b y miR-34c; cuya transcripción es activada por p53.
- Definir el posible papel pronóstico en recaída y en supervivencia de los miRNAs miR-16 y miR-143, cuyos niveles finales en la célula, están modulados por p53.
- Conocer si existen posibles interacciones entre miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-16 y miR-143 a nivel pronóstico.
- Obtención de grupos de riesgo de recaída.
- Relacionar las alteraciones en los niveles de expresión de estos miRNAs con el estado mutacional de TP53.
- Vincular las alteraciones de los niveles de expresión de miR-34a, con el estado de metilación de la región promotora del gen MIR34A.

TRABAJOS

TRABAJO 1

“miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer”

ELENA GALLARDO, ALFONS NAVARRO, NURIA VIÑOLAS, RAMÓN MARRADES, TANIA DÍAZ, BERNAT GEL, ANGELS QUERA, EVA BANDRÉS, JESÚS GARCÍA-FONCILLAS, JOSE RAMIREZ Y MARIANO MONZO

Carcinogenesis vol.30 no.11 pp.1903–1909, 2009

RESUMEN

El CPNCP es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro entorno. A pesar, de que la cirugía es posible en muchos casos, la tasa de recaída es muy alta, incluso en estadios precoces.

Hemos seleccionado una serie retrospectiva de pacientes intervenidos por CPNCP, en estadios I-III, que posteriormente, no recibieron tratamiento adyuvante ni con quimioterapia ni con radioterapia, para establecer el valor pronóstico de la familia de miRNAs miR-34 y su relación con el estado mutacional de TP53.

Para ello se utilizaron muestras parafinadas de tumor y tejido normal pareadas, para la extracción de RNA y cuantificación de los niveles de miR-34a, miR-34b y miR-34c.

Mediante el análisis estadístico de los datos referentes a los niveles de expresión de la familia de miRNAs de miR-34, solamente se asociaron los niveles de miR-34a con la recaída tumoral.

En base al análisis con MaxStat, (paquete de R software), que permite la detección del mejor punto de corte, se establecieron tres grupos en función de la tasa de recaída, dentro de la serie: el grupo con niveles bajos de miR34a, con un 67% de recaída, los que tenían niveles altos, con un 43% de recaída y los que tenían los niveles más altos con un 0% de recaída.

En el análisis univariado para riesgo de recaída, el estado mutacional de P53, los niveles de miR-34a y el estadio IA vs el resto, se correlacionaron con probabilidad de recaída.

Se realizaron dos análisis multivariados, incluyendo o no el estado mutacional de P53, permaneciendo en ambos análisis la expresión de miR-34a, como factor independiente para recaída tumoral.

Se observó que los pacientes con mutaciones de TP53 presentaban una media de expresión de miR-34a más baja. Se observó que el subgrupo de pacientes, en el que los niveles de expresión de miR-34a eran bajos y con mutaciones de TP53, presentaba una alta tasa de recaída.

En los pacientes sin mutaciones de TP53, existe una diferencia significativa en los niveles de expresión de miR-34a entre los pacientes que presentaban la región promotora de MIR34A metilada vs los que no.

Por todo esto, hemos identificado a miR-34a como un nuevo marcador biológico con significación en el pronóstico de la recaída de pacientes sometidos a cirugía del CPNCP, abriendo la posibilidad de una futura herramienta en el algoritmo de decisiones terapéuticas.

miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer

Elena Gallardo^{5,†}, Alfons Navarro^{1,†}, Nuria Vinolas,[~]
Ramon M. Marrades², Tania Diaz¹, Bernat Gel¹,
Angels Quera³, Eva Bandres⁴, Jesus Garcia-Foncillas⁴,
Jose Ramirez³ and Mariano Monzo^{1,†}

Department of Medical Oncology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques, Agust Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain, Human Anatomy and Embryology Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomediques, Agust Pi i Sunyer, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain, ²Department of Pneumology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques, Agust Pi i Sunyer Ciberes (06/06/0028), 08036 Barcelona, Spain, ³Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques, Agust Pi i Sunyer Ciberes, 08036 Barcelona, Spain and ⁴Laboratory of Pharmacogenomics, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain

⁵Present address: Department of Medical Oncology, Hospital Clinico Universitario, 15706 Santiago de Compostela, Spain

[†]To whom correspondence should be addressed. Tel: þ34 93 402 19 03; Fax: þ34 93 403 52 63; Email: mmonzo@ub.edu

MicroRNAs (miRNAs) have been identified as promising prognostic markers in non-small-cell lung cancer (NSCLC) since they play an important role in oncogenesis. The miR-34 family is composed of three miRNAs (miR-34a, miR-34b and miR-34c) that are part of the p53 network and whose expression is directly induced by p53 in response to DNA damage or oncogenic stress. We have analyzed the impact of miR-34 expression on relapse and overall survival in surgically resected NSCLC patients. For this purpose, we used stem-loop reverse transcription-polymerase chain reaction to analyze the expression of the miR-34 family in paired tumor and normal tissue from 70 surgically resected NSCLC patients who received no postsurgical treatment until relapse. In addition, in patients with sufficient tumor tissue, we assessed p53 mutations and the methylation status of the MIRN34A gene promoter region and correlated these findings with miR-34a expression. Molecular findings were correlated with relapse and overall survival. The miR-34 family was downregulated in tumor compared with normal tissue, and low levels of miR-34a expression were correlated with a high probability of relapse ($P = 0.04$). A relation was also found between MIRN34A methylation and miR-34a expression ($P = 0.008$). Patients with both p53 mutations and low miR-34a levels had the highest probability of relapse ($P = 0.001$). In the multivariate analysis, miR-34a expression emerged as an independent prognostic marker for relapse. In summary, we have identified miR-34a as a novel prognostic marker in NSCLC patients, providing a potential mechanism for estimating a patient's risk of disease recurrence and a useful tool to help guide treatment decisions.

Introduction

Lung cancer is the most common cause of cancer death in Europe and worldwide (1). Despite years of research, the prognosis for patients with lung cancer remains dismal. The most frequent type, non-small-cell lung cancer (NSCLC) (85%), shows an overall 5 year survival of

Abbreviations: miRNA, microRNA; MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PCR, polymerase chain reaction.

[†]These authors contributed equally to this work

10% (1,2). Although it is difficult to determine a clear prognosis for an individual NSCLC patient, in part because of the marked heterogeneity of patients with the disease (2), in surgical NSCLC patients, tumor stage is the most important prognostic factor (3). Even after complete resection, recurrence rates are substantial (20-85%, depending on tumor stage) (3). During recent years, various molecular prognostic factors have been analyzed, including markers of tumor proliferation, cellular adhesion and cellular growth (Ras, retinoblastoma and epidermal growth factor receptor) or apoptosis (p53 and Bcl-2) (3). One of the markers that has been extensively studied is

the mutational status of the tumor suppressor gene p53 (4,5), which is frequently mutated or inactivated in human cancers (6). Although several studies have assessed p53 mutations as a prognostic factor for NSCLC, conflicting results have been reported (7-13). About 55% of NSCLCs are reported to contain mutations of the p53 gene, most of which are point mutations located in the region between exons 5 and 8 (14,15), which contains the DNA-binding site of the p53 protein (16).

Recently, the analysis of tumor biology has led to increased interest in microRNAs (miRNAs) (17-22). miRNAs are small non-coding RNAs (22-24 nucleotides in length) that negatively regulate messenger RNA translation to protein. miRNAs are encoded in the entire genome, including the exonic, intronic and intergenic regions, but 90% are found in intronic regions. Their expression levels are regulated by transcription factors (23,24)—for example, the miR-17-92 cluster that is activated by c-myc (24)—or by epigenetic mechanisms—such as methylation of the CpG islands in the promoter region of the gene (25). Moreover, all the mechanisms that alter the normal expression of a gene can affect the expression of an miRNA, including chromosomal translocations, amplifications and deletions or mutations (26,27). High-throughput analyses have shown that miRNA expression is commonly deregulated in several types of cancer including NSCLC (18,28-30). Some miRNAs, like the let-7a family, which appears downregulated in many tumors, have prognostic implications in postoperative survival in NSCLC through Ras regulation (31); patients with low levels of let-7a had shorter survival (20). Other miRNAs, like miR-155 (20,30) or miR-21 (19), also have a role as prognostic markers in NSCLC, where shorter survival has been associated with high levels of miR-155 or miR-21.

The miR-34 conserved family is composed of three miRNAs: miR-34a, miR-34b and miR-34c. There are two miR-34 loci, one encoding miR-34a and the other encoding both miR-34b and miR-34c. The promoter regions of both loci contain a p53-binding site (32). The miR-34 family has been shown to form part of the p53 network (32-35), and the expression is directly induced by p53 in response to DNA damage or oncogenic stress. Moreover, the promoter region of the MIRN34A gene contains CpG islands, and aberrant CpG methylation that reduces miR-34a expression levels has been reported in multiple types of cancer (36). The high frequency of miR-34 silencing in tumors suggests that the miR-34 family acts as a tumor suppressor gene, indicating a potential role as a prognostic marker, although this has not yet been investigated.

In the present study, we have analyzed the prognostic value of miR-34 expression and its relationship with p53 mutations in 70 surgically resected NSCLC patients who received no treatment from curative surgery to relapse.

Materials and methods

Tissue samples

Samples of tumor and paired normal tissue were retrospectively selected from 70 NSCLC patients who underwent potentially curative resection as their first and only treatment between February 1996 and September 2002 at a single institution, Hospital Clinic (Barcelona, Spain). Median age was 64 years (range, 36-86), and 94% were males (Table I). At a median follow-up of

Table I. Main clinical characteristics and correlation with relapse and survival according to the univariate analysis

Characteristic	N 5 70 (%)	P-value relapse	P-value survival
Gender		0.82	0.9
Male	66 (94)		
Female	4 (6)		
Median age, years (range)	64 (35-85)	0.24	0.04
Stage		0.09	0.9
I	39 (55)		
II	17 (25)		
III	14 (20)		
IA versus others		0.033	0.23
PS		0.81	0.5
0/12	17 (25)		
Histologic subtypes	49 (71)		
Adenocarcinoma	3 (4)		
Squamous cell carcinoma			
Others	31 (44.3)	0.5	0.8
Smoking history	36 (51.4)		
Current	3 (4.3)		
Never			
Ex	38 (54.3)	0.47	0.5
p53 mutation	1 (1.4)		
No	31 (44.3)		
Yes	39 (55.7)	0.042	0.4
	18 (25.7)		

38 months (range, 1-127), overall 5 year survival was 53.3% and 33 patients (47%) had relapsed. Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Signed informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

RNA extraction and miRNA quantification

Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) as per the manufacturer's protocol. Taqman quantitative real time-polymerase chain reaction (PCR) miRNA assay of miR-34a, miR-34b and miR-34c was used to quantify expression levels, as described previously (37), using an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. Normalization was performed with miR-191, based on preliminary analyses comparing the stability of miR-24, RNU6B and miR-191; miR-191 had the lowest expression variability in the miRNA expression patient dataset (38) and was therefore used in this study.

MIRN34A gene methylation analysis

The methylation status of the promoter region of the MIRN34A gene was examined in DNA extracted from tumor tissue. The DNA methylation status of the CpG islands was determined by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) after genomic DNA (1 μ g) was subjected to sodium bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation kit as recommended by the manufacturer (Zymo Research, Orange, CA). For MSP, the modified DNA was amplified with primers capable of annealing either methylated or unmethylated cytosine residues. Oligonucleotide sequences used for the MSP were as follows: mir34U 5'-IIGGTTTGGGTAGGTGTGTTT-3#; mir34U.r 5'-AATCCTCATCCCCCTCACCA-3#; mir34M 5'-GGTTTTGGGTAGGCGGTTTC-3# and mir34M.r 5'-TCCTCATCCCCCTCACCG-3#. Primer sequences, polymerase chain reaction (PCR) conditions and product sizes for each methylation marker were analyzed, and the specificity of the MSP assays has been described previously (36). PCR products were visualized after gel electrophoresis in 2% agarose wt/vol containing ethidium bromide. Commercially modified DNA (Chemicon International, Temecula, CA) and normal blood DNA were used as positive controls for methylated and unmethylated alleles, respectively.

p53 mutation analysis

PCR was performed on 100 ng DNA samples to identify p53 mutations. The mutation analysis included p53 exons 5-8. PCR primers and conditions for mutation analysis have been described previously (39). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (2% wt/vol), purified and used in two sequencing reactions per exon (forward and reverse), using the Big Dye

Terminator Cycle Sequencing kit (version 3.1, Applied Biosystems). Reactions were loaded into an ABI-3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). All sequences were analyzed with the SeqScape software (Applied Biosystems).

Statistical methods

All statistical analyses were performed with SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and R v. 2.6.0 software. The primary end points of the study were relapse and overall survival. miR-34a expression was dichotomized using the maxstat package of R in order to determine the cutoff that best discriminated between different groups of patients for relapse and overall survival (40). The univariate analysis of relapse was performed using the Gray test (41). The cumulative incidence was computed with the cmprsk package for R. All variables that were significant in the univariate analysis were included in a multivariate analysis of relapse performed using the subdistribution regression model of Fine et al. (42) with the cmprsk package. Overall survival was calculated with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

Group comparisons of categorical variables were performed with Fisher's exact test. All P-values were two sided and represent raw values. Statistical significance was set at P ,0.05.

Results

miR-34a, miR-34b and miR-34c expression and clinical outcome

The normalized real-time PCR results from 70 primary NSCLC tumor samples showed that miR-34a (P , 0.001) and miR-34b (P 5 0.02) were downregulated in tumor tissue compared with paired normal tissue, but no significant difference in miR-34c expression levels was observed (Figure 1).

In order to examine the prognostic implications of the expression levels of miR-34a, miR-34b and miR-34c, we used the cutoff selected by the maxstat package of R. A significant association with relapse was observed only for miR-34a. Maxstat identified two significant cutoffs: one below (cutoff 1) and one above (cutoff 2) the median expression of normal tissue (Figure 2). When patients were divided according to cutoff 1, 16 of 24 patients (67%) with low levels of miR-34a relapsed compared with 17 of 46 patients (37%) with high levels (P 5 0.04). Cutoff 2 identified seven patients (10%) with the highest levels of miR-34a, none of whom relapsed (P 5 0.023). Using both cutoffs enabled us to identify three groups of patients with different rates of relapse: 67% for those with low levels; 43% for those with high levels and 0% for those with the highest levels (P 5 0.039) (Figure 2). No significant correlation was observed between either miR-34b or miR-34c and relapse. In the univariate analysis for relapse, in addition to miR-34a, only stage IA versus other stages and the presence of p53 mutations significantly correlated with probability of relapse.

We performed two independent multivariate analyses for relapse: one without p53 mutational status (all 70 patients) (Table II) and another including p53 mutational status (57 patients) (Table II). In the first analysis, miR-34a (relative risk 5 2.17; P 5 0.004) and disease stage (stage IA versus others) (relative risk 5 2.9; P 5 0.04) were independent factors for relapse. In the second analysis, only miR-34a expression emerged as an independent factor for relapse (relative risk 5 1.9; P 5 0.024).

No correlation was observed between survival and miRNA expression or clinical characteristics, with the exception of age (P 5 0.04).

Regulation of miR-34a expression: p53 mutations and methylation status

In order to further investigate the reasons for differences in miR-34a expression levels between patients, we analyzed p53 mutations and the methylation status of the promoter region of the MIRN34A gene in patients for whom sufficient tumor tissue was available.

p53 mutations

p53 mutations were assessed in 60 samples, 18 of whom (30%) had p53 mutations (Table III). Although no significant correlation was observed between mutation status and miR-34a expression levels (P 5 0.1) (Figure 3A), the median miR-34a expression in those with mutations (median 5 0.11 \pm 0.57) was lower than in those without mutations (median 5 0.26 \pm 0.58). Furthermore, when patients were

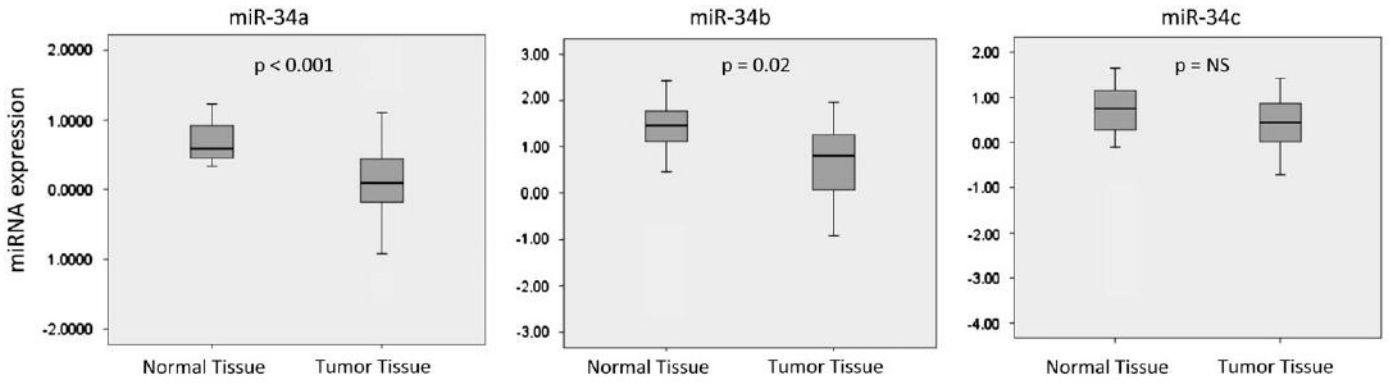


Fig. 1. miR-34a, miR-34b and miR-34c expression. The data are shown as Log10 of relative quantification ($2^{\Delta\Delta_{ct}}$). miR-191 was used as endogenous normalization control. miR-34a (P , 0.001) and miR-34b (P 5 0.02) were downregulated in tumor tissue compared with paired normal tissue, but no significant (NS) difference in miR-34c expression levels was observed.

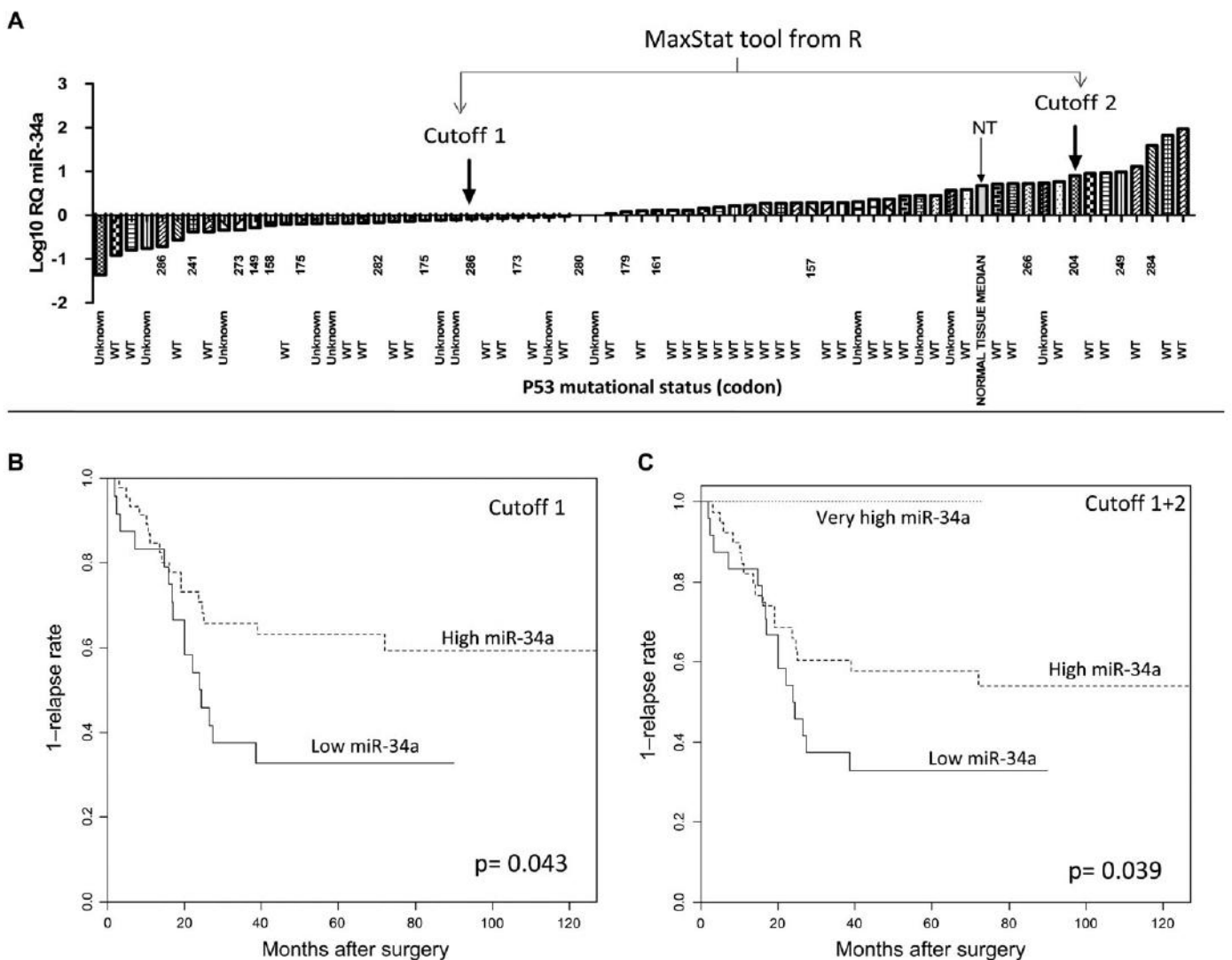


Fig. 2. miR-34a expression and relapse. miR-191 was used as normalization control. (A) miR-34a expression and cutoffs, as selected by maxStat. The data are shown as Log10 of relative quantification (RQ) ($2^{\Delta\Delta_{ct}}$). miR-191 was used as endogenous normalization control. Patients are classified according to their miR- 34a expression, and numbers indicate patients harboring p53 mutations. Unknown refers to patients in whom p53 status was not clear; WT indicates wild-type (non-mutated) p53 and the number indicates the codon where the mutation is located. NT indicates the median of expression in the normal tissues analyzed. miR-34a expression was dichotomized using the maxstat package of R in order to determine the cutoff that best discriminated between different groups of patients for relapse. Maxstat identified two significant cutoffs: one below (cutoff 1) and one above (cutoff 2) the median expression of normal tissue. (B) Probability of relapse using cutoff 1. (C) Probability of relapse using cutoffs 1 and 2.

divided into those with high versus low miR-34a expression, p53 mutations were found more frequently in those below (13/29, 45%) than in those above (5/28, 18%) the median expression level (P 5 0.04).

No significant correlation was found between the location of the p53 mutation (exon 5, 6, 7 or 8) and miR-34a expression levels. However, patients with mutations in exon 5 showed a more marked

Table II. Multivariate analysis of relapse including all factors with univariate P-value ,0.1

Factor	RR	P-value
A) Multivariate analysis of relapse without p53 mutational status (all 70 patients)		
Stage IA versus others	2.9	0.04
miR-34a expression	2.17	0.004
B) Multivariate analysis of relapse including p53 mutational status (57 patients)		
Stage IA versus others		0.1
P53 mutations		0.2
miR-34a expression	1.9	0.024

RR, relative risk.

Table III. Patients carrying p53 mutations and their miR-34a expression by cutoff 1

Patient	Exon	Codon	Nucleotide/ change	AA change	Type of mutation	miR-34a levels (cutoff 1)
P1	5	161	GCC/ACC	Ala/Thr	Transition	High
P2	5	157	GTC/TTC	Val/Phe	Transversion	High
P3	5	175	CGC/CAC	Arg/His	Transition	Low
P4	5	149	TCC/TTC	Ser/Phe	Transversion	Low
P5	5	179	CAT/CGT	His/Arg	Transversion	High
P6	5	158	CGC/CTC	Arg/Leu	Transversion	Low
P7	5	175	CGC/CAC	Arg/His	Transition	Low
P8	6	204	GAG/TAG	Glu/STOP	Transversion	High
P9	7	249	AGG/AGT	Arg/Ser	Transversion	High
P10	7	241	TCC/TAC	Ser/Phe	Transversion	Low
P11	8	280	AGA/ATA	Arg/Ile	Transversion	High
P12	8	273	CGT/CAT	Arg/His	Transition	Low
P13	8	282	CGG/TGG	Arg/Tip	Transition	Low
P14	8	273	CGT/CTT	Arg/His	Transition	High
P15	8	286	GAA/AAA	Glu/Lys	Transition	Low
P16	8	286	GAA/AAA	Glu/Lys	Transition	Low
P17	8	284	ACA/ATA	Thr/Ile	Transition	High
P18	8	266	GGA/AGA	Gly/Arg	Transition	High

downregulation of miR-34a than those with mutations in the other exons (P 5 0.06) (Figure 3B).

The relapse rate for patients with p53 mutations was 61.1% compared with 35.9% for those without p53 mutations (P 5 0.04). Eight patients had both p53 mutations and miR-34a expression below the cutoff 1 level. A total of 87.5% of these patients relapsed compared with 36.7% of the remaining patients (P 5 0.001) (Figure 4B).

Methylation status

Methylation status in the promoter region of the MIRN34A gene was assessed in 31 patients. Eight (26%) were unmethylated, 20 (64%) were methylated/unmethylated (patients that showed amplification in the MSP assay with both pairs of primers) and 3 (10%) were methylated (supplementary Figure 1 is available at Carcinogenesis Online). Unmethylated patients had significantly higher levels of miR-34a than the other two groups (P 5 0.008) (Figure 5). In addition, the group of unmethylated patients showed a wide range of miR-34a expression levels [median 5 0.51; range (Å0.18 to 0.98); variance 5 0.159].

Finally, when we analyzed the relation between MIRN34A methylation status and miR-34a expression in the 23 patients without p53 mutations, 6 (26%) were unmethylated, 14 (61%) were methylated/unmethylated and 3 (13%) were methylated. In this subgroup of patients, the variance decreased [median 5 0.56; range (0.18 to 0.73); variance 5 0.058], and the difference in median expression levels was more significant between methylated and unmethylated patients (P 5 0.004) (Figure 5).

Discussion

In the present study, we have examined the role of miR-34 as a prognostic factor in NSCLC patients treated only with curative surgery. In our series of patients, miR-34a and miR-34b were significantly down-regulated, and low levels of miR-34a in tumor samples correlated with a high rate of relapse. Moreover, miR-34a levels were modulated by methylation of the promoter region of the MIRN34A gene. The frequency of p53 mutations was significantly higher in patients with low miR-34a expression, and the group of patients with both p53 mutations and low miR-34a expression had a very poor prognosis, indicating a potential synergism for these two factors.

miR-34 transcription is directly induced by p53 in response to genotoxic stress and acts downstream to promote cell-cycle arrest or apoptosis (32,43,44). Importantly, miR-34 enables p53 to regulate the expression of a large number of proteins, even after their transcripts have already been synthesized, without the need for translation of additional effector proteins in situations of cellular stress. In vitro miR-34a overexpression leads to decreased proliferation and activation of apoptosis in multiple tumoral cells (43,45-49), indicating a role for miR-34a as a tumor suppressor gene, and in fact, miR-34a is lost or downregulated in many tumors (43,45-52). In the present study,

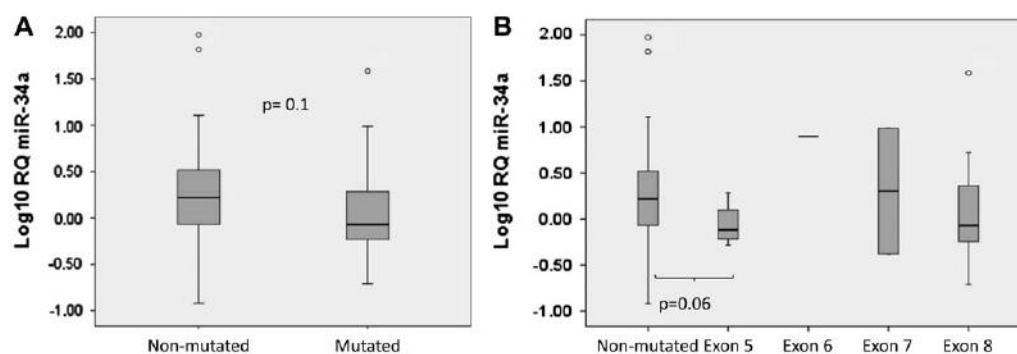


Fig. 3. Association between miR-34a expression (with miR-191 as normalization control) and p53 mutational status. (A) miR-34a expression in patients with and without p53 mutations. (B) miR-34a expression according to location of p53 mutation. Patients with mutations in exon 5 showed a non-significant trend toward greater downregulation of miR-34a.

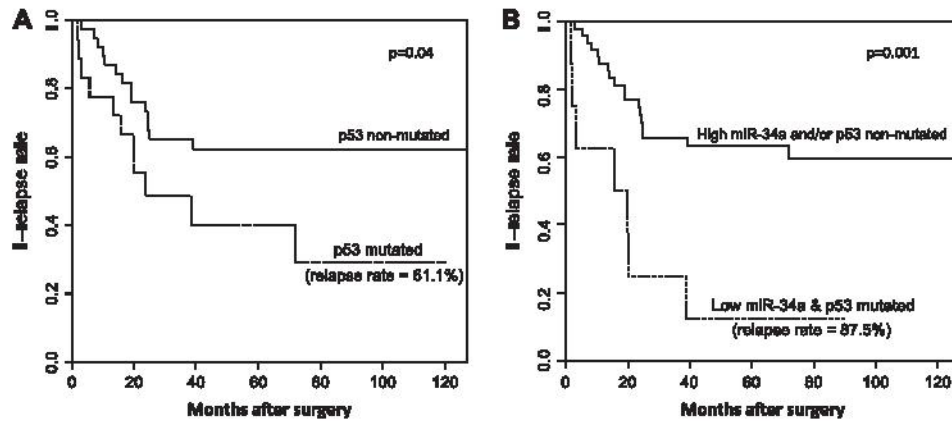


Fig. 4. Probability of relapse for patients according to p53 mutation status and miR-34a levels. (A) Relapse rate for patients according to p53 mutation status. Those with mutations had a higher relapse rate. (B) Relapse rate for patients with both low miR-34a levels and p53 mutations versus all other patients. Those with low miR-34a levels and p53 mutations had a higher relapse rate, indicating that miR-34a and p53 mutations synergize to stimulate relapse.

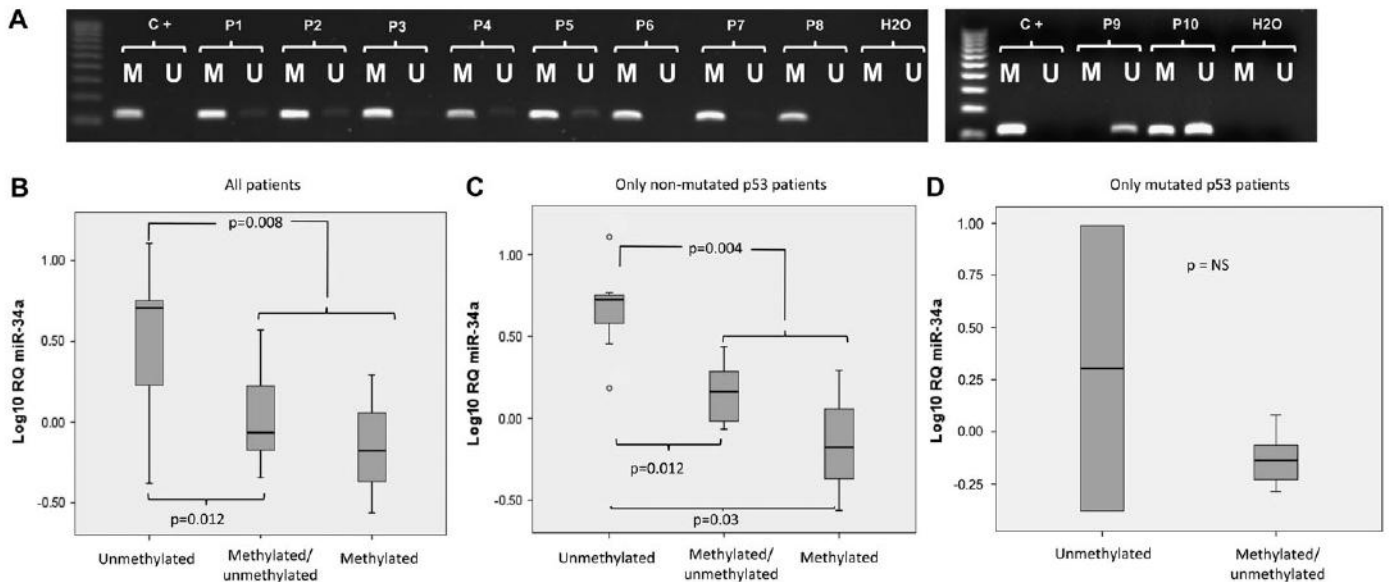


Fig. 5. miR-34a expression (miR-191 as normalization control) according to the methylation status of MIRN34A. The methylated/unmethylated group includes the patients that showed amplification in the MSP assay with both pairs of primers. (A) Examples of methylation analysis results (methylated, methylated/unmethylated and unmethylated). PCR products of 10 patients are shown in two gels (2% agarose). P1, P2, P3, P4, P5, P7 and P10 are methylated/unmethylated, P6 and P8 are methylated, and P9 is unmethylated. Commercially modified DNA was used as positive control (Cp) for methylated alleles. The MSP analyses for all patients are shown in supplementary Figure 1 (available at Carcinogenesis Online). (B) miR-34a expression in all 31 patients in whom methylation status was assessed. (C) miR-34a expression in 23 patients without p53 mutations. (D) miR-34a expression in seven patients with p53 mutations.

patients with low miR-34a expression had a higher risk of relapse than those with high expression, indicating that interindividual differences in miR-34a expression may have an impact on rate of relapse.

In vitro inactivation of endogenous miR-34a effectively inhibits p53-dependent apoptosis. However, increasing miR-34a levels elicits only a very mild increase in apoptosis, suggesting that miR-34a may be a necessary but not sufficient requisite (44). Patients with both p53 mutations and low miR-34a expression have alterations in two important points of the p53 pathway. In the present study, this group of patients had the highest risk of relapse, leading us to hypothesize that the impact of miR-34a on cell death may be greatest when acting synergistically with additional modulators.

In chronic lymphocytic leukemia deleted and/or mutated p53 correlates with low levels of miR-34a (53), although a significant correlation was not found in the present study. However, there is some evidence in NSCLC that p53 mutations can have different repercussions depending on their location (54), and this may have had a bear-

ing on the results in the present study, where patients harboring exon 5 mutations tended to have lower miR-34a expression levels.

Moreover, in addition to p53 mutations, other mechanisms can decrease miR-34 expression; for example, the miR-34-encoding genes themselves may be targets for mutational or epigenetic inactivation in cancer (55). Loss of miR-34a expression in neuroblastoma was associated with the deletion of a region on chromosome 1p36, a common event in neuroblastoma (46,55,56). Aberrant CpG methylation that reduces the expression levels of miR-34a has also been reported in multiple types of cancer (36), and in the present study, a correlation was found between methylation status and miR-34a expression.

p53 induces cell-cycle arrest, cellular senescence and apoptosis through various targets. miR-34a is a direct transcriptional target of p53 and is upregulated in the presence of a functional p53 pathway. miR-34a itself induces apoptosis, cellular senescence and cell-cycle arrest through silencing of other potential targets, such as

cyclin-dependent kinases 4 and 6, CCND1, MYCN and Sirtuin1 (33,57-59). miR-34a-based therapeutic approaches could thus be useful in patients with a non-functional p53 pathway, where increasing miR-34a levels may provide an alternative to p53-induced apoptosis. Though miRNA-based therapies are still in the preliminary stages, some promising results have been reported. For example, aerosol application of let-7a has been shown to increase expression levels in mouse lungs, leading to a decrease in tumor size (60). The present study shows a link between MIRN34A methylation status and miR-34a expression levels, raising the possibility that miR-34a expression could be induced by demethylation therapies such as 5-azacytidine (61).

In summary, we have identified miR-34a as a novel prognostic marker in NSCLC patients, providing a potential mechanism for estimating a patient's risk of disease recurrence and an additional useful tool to guide treatment decisions regarding adjuvant therapy. Further investigation in a prospective study is warranted to validate these findings and to examine potential miR-34a-based therapeutic approaches.

Supplementary material

Supplementary Figure 1 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS-PI060087); Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica ~ (SEPAR-2009).

Acknowledgements

Tania Di'az is an FI fellow supported by Agencia de Gestio d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya and Fondo Social Europeo. Ciber de Respiratorio (Ciberes) is an initiative from Instituto de Salud Carlos III. Preliminary results of this study were previously reported at the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology in 2008 (abstract 11029).

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Jemal,A. et al. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.*, 58, 71-96.
- Herbst,R.S. et al. (2008) Lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 359, 1367-1380.
- Brundage,M.D. et al. (2002) Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*, 122, 1037-1057.
- Mitsudomi,T. et al. (1993) Detection and sequencing of p53 gene mutations in bronchial biopsy samples in patients with lung cancer. *Chest*, 104, 362-365.
- Mitsudomi,T. et al. (1993) Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.*, 85, 2018-2023.
- Hollstein,M. et al. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- Quinlan,D.C. et al. (1992) Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res.*, 52, 4828-4831.
- Horio,Y. et al. (1993) Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 53, 1-4.
- Ebina,M. et al. (1994) Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 54, 2496-2503.
- Fukuyama,Y. et al. (1997) K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 75, 1125-1130.
- McLaren,R. et al. (1992) The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br. J. Cancer*, 66, 735-738.
- Passlick,B. et al. (1995) Immunohistochemical detection of P53 protein is not associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 109, 1205-1211.
- Lee,J.S. et al. (1995) Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J. Clin. Oncol.*, 13, 1893-1903.
- Chiba,I. et al. (1990) Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Study Group. Oncogene*, 5, 1603-1610.
- Greenblatt,M.S. et al. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54, 4855-4878.
- Cho,Y. et al. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265, 346-355.
- Garofalo,M. et al. (2008) MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 27, 3845-3855.
- Jay,C. et al. (2007) miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol.*, 26, 293-300.
- Markou,A. et al. (2008) Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin. Chem.*, 54, 1696-1704.
- Takamizawa,J. et al. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64, 3753-3756.
- Weiss,G.J. et al. (2008) EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann. Oncol.*, 19, 1053-1059.
- Yu,S.L. et al. (2008) MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 13, 48-57.
- Georges,S.A. et al. (2008) Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res.*, 68, 10105-10112.
- Aguda,B.D. et al. (2008) MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 19678-19683.
- Fabbri,M. (2008) MicroRNAs and cancer epigenetics. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 9, 583-590.
- Calin,G.A. et al. (2006) MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 25, 6202-6210.
- Calin,G.A. et al. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 857-866.
- Nana-Sinkam,S.P. et al. (2006) MicroRNA in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 1, 929-931.
- Wang,Y. et al. (2007) Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research. *BMC Genomics*, 8, 29.
- Yanaihara,N. et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9, 189-198.
- Johnson,S.M. et al. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 635-647.
- He,L. et al. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447, 1130-1134.
- Yamakuchi,M. et al. (2009) MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*, 8, 712-715.
- He,X. et al. (2007) The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res.*, 67, 11099-11101.
- He,L. et al. (2007) microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat. Rev. Cancer*, 7, 819-822.
- Lodygin,D. et al. (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7, 2591-2600.
- Navarro,A. et al. (2009) MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology*, 76, 162-169.
- Peltier,H.J. et al. (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*, 14, 844-852.
- Ramirez,N. et al. (2008) Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur. J. Cancer*, 44, 2689-2695.
- Hothorn,T. et al. (2003) On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput. Stat. Data Anal.*, 43, 121-137.
- Gray,R.J. (1988) A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann. Stat.*, 16, 1141-1154.
- Fine,J.P. et al. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.*, 94, 496-509 Ref Type: Abstract.
- Chang,T.C. et al. (2007) Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell*, 26, 745-752.
- Raver-Shapira,N. et al. (2007) Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell*, 26, 731-743.

45. Li,N. et al. (2009) miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 275, 44-53.
46. Welch,C. et al. (2007) MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 26, 5017-5022.
47. Yan,D. et al. (2008) MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50, 1559-1565.
48. Fujita,Y. et al. (2008) Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 114-119.
49. Rokhlin,O.W. et al. (2008) MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 7, 1288-1296.
50. Zenz,T. et al. (2009) MiR-34a as part of the chemotherapy resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 113, 3801-3808.
51. Tazawa,H. et al. (2007) Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 15472-15477.
52. Tarasov,V. et al. (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 6, 1586-1593.
53. Mraz,M. et al. (2009) miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*, 23, 1159-1163.
54. Huang,C. et al. (1998) Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 16, 2469-2477.
55. Feinberg-Gorenshtein,G. et al. (2009) Reduced levels of miR-34a in neuroblastoma are not caused by mutations in the TP53 binding site. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 539-543.
56. Cole,K.A. et al. (2008) A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol. Cancer Res.*, 6, 735-742.
57. Wei,J.S. et al. (2008) The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene*, 27, 5204-5213.
58. Yamakuchi,M. et al. (2008) miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 13421-13426.
59. Sun,F. et al. (2008) Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett.*, 582, 1564-1568.
60. Esquela-Kerscher,A. et al. (2008) The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*, 7, 759-764.
61. Esteller,M. (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br. J. Cancer*, 94, 179-183.

Received June 12, 2009; revised September 1, 2009;
accepted September 3, 2009

TRABAJO 2

“Prognostic Implications of miR-16 Expression Levels in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer”

ALFONS NAVARRO, TANIA DIAZ, ELENA GALLARDO, NURIA VIÑOLAS, RAMON M. MARRADES, BERNAT GEL, MARC CAMPAYO, ANGELS QUERA, EVA BANDRES, JESUS GARCIA-FONCILLAS, JOSE RAMIREZ AND MARIANO MONZO1

Journal of Surgical Oncology 2011;103:411–415

RESUMEN

Los miRNAs son nuevos reguladores de la expresión genética, ligados a las principales vías de oncogénesis, incluyendo la vía de p53. p53 activa la transcripción de la familia de miRNAs de miR-34 y regula la maduración de miR-16 y miR143.

Hemos analizado la expresión de miR-143 y miR-16 en el tejido normal y tumoral pareado de cada paciente de una serie de 70 pacientes diagnosticados y tratados mediante cirugía de CPNCP en estadios I-III, en los que previamente se había examinado la expresión de miR-34a y correlacionado con la evolución clínica.

Los pacientes son clasificados en 3 grupos de acuerdo a sus niveles de expresión de miR-16(alto, normal y bajo).

Aquellos pacientes con niveles normales tuvieron la mejor evolución, mientras que aquellos con niveles más altos tuvieron la peor.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) era de 22,4 meses para los pacientes con niveles altos de miR-16, 71,8 meses para los de niveles normales y de 55,8 meses para los de niveles bajos.

La supervivencia global (SG) fue de 23,9 meses para los que tenían niveles altos de miR-16, de 97,6 meses para los que tenían niveles normales y 63,5 meses para aquellos con niveles bajos.

No se observó correlación entre los niveles de miR-143 y la evolución clínica de los pacientes.

El análisis multivariado mostró a miR-16 como factor pronóstico independiente de SLE y SG.

En un análisis secundario, examinamos la correlación potencial entre la expresión de miR-16 y miR-34a y el estado mutacional de TP53.

No hubo correlación entre el estado mutacional de TP53 y miR-16, pero si se observó una interacción entre miR-16 y miR-34a.

En los pacientes con niveles altos de miR-34a, se observaron diferencias entre SLE Y SG, de acuerdo a los niveles de expresión de miR-16, mientras que en los pacientes con niveles bajos de miR-34a presentaban un pobre pronóstico, independientemente de los niveles de expresión de miR-16.

Estos resultados nos indican por primera vez el valor pronóstico de los niveles de miR-16 en las muestras de tumor, de los pacientes intervenidos de CPNCP, además del posible sinergismo entre miR-34a y miR-16.

Prognostic Implications of miR-16 Expression Levels in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer

ALFONS NAVARRO, PhD,¹ TANIA DIAZ, MSc,¹ ELENA GALLARDO, MD,² NURIA VINOLAS, MD, PhD,⁴ RAMON M. MARRADES, MD, PhD,³ BERNAT GEL, MSc,⁴ MARC CAMPAYO, MD,² ANGELS QUERA, MD,⁵ EVA BANDRES, PhD,⁶ JESUS GARCIA-FONCILLAS, MD, PhD,⁶ JOSE RAMIREZ, MD, PhD,⁵ AND MARIANO MONZO, MD, PhD^{1*}

¹Human Anatomy and Embryology Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Department of Medical Oncology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

³Department of Pneumology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Ciberes (06/06/0028), Barcelona, Spain

⁴LSI Department, Technical University of Catalonia (UPC), Barcelona, Spain

⁵Department of Pathology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Ciberes, Barcelona, Spain

⁶Laboratory of Pharmacogenomics, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain

Background: MicroRNAs are novel regulators of gene expression that are linked to the main oncogene networks, including the p53 pathway. p53 regulates the maturation process of miR-16 and miR-143. We analyzed the role as prognostic markers of miR-16 and miR-143 in 70 non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients.

Methods: MicroRNAs were analyzed by TaqMan MicroRNA assays. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were examined using Kaplan-Meier curves with log-rank tests and the Cox proportional hazard model.

Results: When patients were classified in three groups according to their miR-16 expression levels, those with normal levels had the best outcome while those with high levels had the worst. DFS was 22.4 months for patients with high levels, 71.8 months for those with normal levels, and 55.8 months for those with low levels ($P = 0.05$). OS was 23.9 months for patients with high levels, 97.6 months for those with normal levels, and 63.5 months for those with low levels ($P < 0.001$). In the multivariate analyses, high miR-16 levels emerged as an independent prognostic factor for poor DFS ($P = 0.001$) and OS ($P < 0.001$).

Conclusions: Our results provide the first hints that miR-16 levels in tumor samples may be a prognostic marker in NSCLC.

J. Surg. Oncol. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: microRNA (miRNA); miR-16; miR-143; prognostic marker; NSCLC; lung cancer; disease-free survival; overall survival

INTRODUCTION

The tumor suppressor gene P53 has been widely studied in non-small-cell lung cancer (NSCLC) [1-12] and is mutated in 55% of cases [3,6]. MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that regulate mRNA translation to protein [13]. It has been reported that p53 directly induces the expression of a cluster of miRNAs [14,15]. Through its DNA binding domain, the p53 protein activates the expression of the miR-34 family in response to DNA damage or oncogenic stress, leading to apoptosis or cell cycle arrest [14-17]. In a previous work, our group explored the potential role of the miR-34 family as a prognostic marker in NSCLC [16] and found that low levels of miR-34a expression correlated with a greater risk of relapse in resected NSCLC patients who received no treatment from curative surgery to relapse. Moreover, a synergistic effect between p53 and miR-34a levels was observed whereby patients with both p53 mutations and low miR-34a levels presented the highest relapse rate. Recently, a novel interaction between

p53 and the miRNA biogenesis pathway has been described. In miRNA biogenesis, the primary transcripts of miRNA genes (pri-miRNAs) are cleaved into hairpin intermediates (pre-miRNAs) by the nuclear RNase III Drosha and further processed to mature miRNAs by the cytosolic RNase III Dicer. The Drosha complex comprises Drosha, the DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) and multiple RNA-associated proteins including the DEAD-box RNA helicases p68 and p72 [13]. p53 interacts with the Drosha processing complex through the association with DEAD-box RNA helicase p68 and facilitates the

transformation of pri-miRNAs to pre-miRNAs [18], thus regulating the miRNA maturation process. miR-16 and miR-143, which suppress cell proliferation [19], have recently been related to this p53-regulated maturation process [18]. Based on our previous findings that p53-related miRNAs can impact prognosis in NSCLC [16], we examined expression levels of miR-16 and miR-143 in 70 NSCLC patients and correlated the results with clinical outcomes; in addition, we evaluated the relation of these miRNAs and p53 mutations.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Elena Gallardo present address is Department of Medical Oncology, Hospital Clínic Universitario, Santiago de Compostela, Spain.

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social; Grant numbers: FIS-PI060087; FIS-PI040123; Grant sponsor: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica; Grant number: SEPAR-2009.

*Correspondence to: Dr. Mariano Monzo, MD, PhD, Human Anatomy Unit, Molecular Oncology Laboratory, Medical School, University of Barcelona, IDIBAPS, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Fax: þ34 93 403 52 63. E-mail: mmonzo@ub.edu

Received 27 August 2010; Accepted 29 November 2010

DOI 10.1002/jso.21847

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

MATERIALS AND METHODS

Patients

Samples of tumor and paired normal tissue were retrospectively selected from 70 NSCLC patients who underwent potentially curative resection as their first and only treatment between February 1996 and September 2002 at a single institution, Hospital Clinic (Barcelona, Spain). Median age was 64 years (range 36-86), and 94% were males (Table I). At a median follow-up of 38 months (range 1-127), overall 5-year survival was 53.3% and 33 patients (47%) had relapsed. As an additional control of normal tissue, we also analyzed lung samples from five bodies donated to the Body Donation Service of the School of Medicine of the University of Barcelona. All donors had died due to non-cancer-related causes less than 24 hr before the extraction of the tissue samples. Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. Signed, informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

RNA Extraction and miRNA Quantification

Total RNA and miRNA detection was performed from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues as previously described [16]. Briefly, total RNA was extracted using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) as per the manufacturer's protocol. MicroRNA detection was performed using commercial assays (TaqMan MicroRNA assays, Applied Biosystems) for miR-16 and miR-143 in an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. The appropriate negative controls (non-template control) were also run in each reaction. All reactions were performed

in triplicate. Relative quantification was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Normalization was performed with miR-191, based on preliminary analyses [20] comparing the stability of miR-24, RNU6B, and miR-191; miR-191 had the lowest expression variability in the miRNA expression patient dataset and was therefore used in this study. We used the median of normal tissue expression as calibrator sample in order to obtain a cutoff for each group of patients.

p53 Mutation Analysis

PCR was performed on 100 ng DNA samples to identify p53 mutations. The mutation analysis included p53 exons 5-8. PCR primers and conditions for mutation analysis have been described previously [16]. For P53 analysis we have used the following primers obtained from Sigma-Aldrich Química, S.A. (Madrid, Spain): p53 exon 5, 5'-GGA ATTCTTCTCCTGCAGTAC-3' and 5'-GGAATTCGCCCCAGCTG CTCACCATCG-3'; p53 exon 6, 5'-GGAATTCGATGGTGAGCAG CTGG-3' and 5'-GGAATCAGTTGCAAACCAGACCTCAGG-3'; p53 exon 7, 5'-GGAATTCTCCTAGGTTGGCTCTGAC-3' and 5'-GGAATCCAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3'; and p53 exon 8, 5'-GGAATTCCTATCCTGAGTAGTGTTAA-3' and 5'-GGAATTCCT GCTTGCTTACCTCG-3'. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (2% wt/vol), purified and used in two sequencing reactions per exon (forward and reverse), using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (version 3.1, Applied Biosystems). Reactions were loaded into an ABI-3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). All sequences were analyzed with the SeqScape software (Applied Biosystems). The p53 mutation analysis was performed only in 57 patients because the remaining 13 patients had insufficient tissue for DNA extraction.

TABLE I. Main Clinical Characteristics and Correlation With Relapse and Survival According to the Univariate Analyses

	No. of patients (N / 70), N (%)	Log rank P-value	
		DFS	Survival
Gender		0.5	0.9
Male	66 (94%)		
Female	4 (6%)		
Median age, years (range)	64 (35-85)	0.7	0.04
Stage		0.8	0.9
I	39 (55%)		
II	17 (25%)		
III	14 (20%)		
IA versus others		0.2	0.23
PS		0.6	0.5
0/1/2	17 (25%)		
Histologic subtypes	49 (71%)		
Adenocarcinoma	3 (4%)		
Squamous cell carcinoma		0.5	0.8
Others	31 (44.3%)		
Smoking history	36 (51.4%)		
Current	3 (4.3%)		
Never		0.1	0.5
Former	38 (54.3%)		
p53 mutation	1 (1.4%)		
No	31 (44.3%)		
Yes		0.1	0.4
miR-16 expression	39 (55.7%)		
High	18 (25.7%)		
Normal		0.05	<0.001
Low	8 (11.4%)		
	29 (41.4%)		
	33 (47.2%)		

Journal of Surgical Oncology

Statistical Methods

All statistical analyses were performed with SPSS 14.0 (Chicago, IL). The primary endpoints of the study were disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), defined as the time between surgery and either recurrence or death (DFS) or death from any cause (OS). DFS and OS were calculated with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. All prognostic variables in the univariate analysis with a P-value at or below 0.1 were included in the multivariate analysis in order to eliminate the redundancy among highly correlated characteristics, each of which may be individually significant. This multivariate analysis was performed using the stepwise proportional hazard Cox regression model. Statistical significance was set at P 0.05. Optimal cutoffs of miRNA expression data for DFS and OS were assessed by means of maximally selected log-rank statistics [21] using the Maxstat package (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria). miR-16 expression >0.22 was classified as "high," and miR-16 expression <0.22 was classified as "low." Expression between these two values was classified as "normal." The applicability of these cutoffs was confirmed by the Kaplan and Meier test.

RESULTS

miR-16 Expression and Clinical Outcome

Paired tumor and normal tissue samples were obtained from 70 NSCLC patients (Table I). The normalized real-time PCR results showed that overall miR-16 (Fig. 1) and miR-143 (Supplementary Fig. 1) were downregulated in tumor compared to normal tissue (P < 0.001 and P ¼ 0.001, respectively).

Using the two cutoffs identified by the Maxstat package of R [19], patients were classified as having high, normal or low expression levels of miR-16 (Fig. 1). miR-16 expression levels in the majority of the

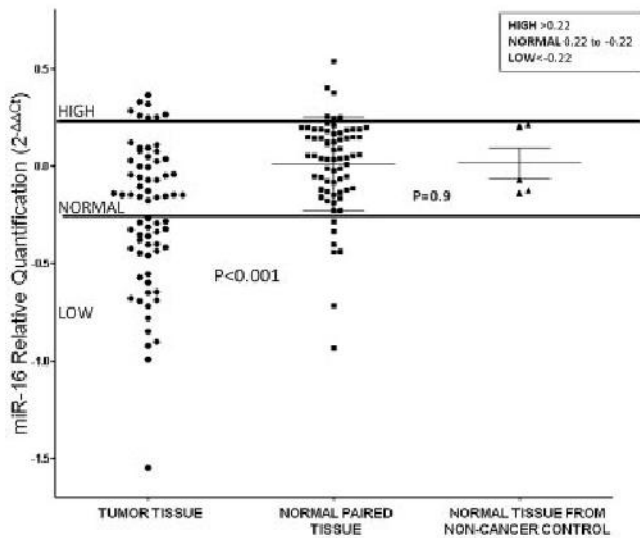


Fig. 1. Normalized miR-16 expression in tumor and paired normal tissue from NSCLC patients and normal controls. The two horizontal lines show the two selected cutoffs by the Maxstat package of R software, which identified three groups: high, normal, and low expression.

normal tissue samples obtained from patients were within the normal range; moreover, miR-16 levels in the five samples obtained from non-cancer body donors were all within the normal range. No significant cutoff was identified for miR-143.

Expression levels were correlated with DFS and OS and a significant association with DFS and OS was observed only for miR-16. DFS for patients with high levels was 22.4 months (95% CI: 8.4-36.4), while it was 71.8 months (95% CI: 51.8-91.8) for those with normal levels and 55.8 months (95% CI: 38.4-73.4) for those with low levels (P ¼ 0.05). Mean OS was 23.9 months (95% CI: 10.3-37.4) for patients with high levels, 97.6 months (95% CI: 79.7-115.5) for those with normal levels, and 63.5 months (95% CI: 46.3-80.7) for those with low levels (P < 0.001) (Fig. 2). Since DFS was similar for patients with normal

and low levels of miR-16, in an exploratory analysis, we combined patients with normal and low expression in one group and compared outcomes to patients with high levels. For the group of patients with normal or low levels, DFS was 65.5 months (95% CI: 51.6-79.5) (P ¼ 0.01). No other clinicopathological characteristic was significantly associated with DFS, and only age (P ¼ 0.04) was associated with OS (Table I).

In the multivariate analyses (including age, gender, and all factors with univariate P-value 0.1), p53 mutational status (odds ratio [OR], 2.2; P ¼ 0.04) and high miR-16 expression (OR, 8.5; P ¼ 0.001) emerged as independent prognostic markers for DFS, while both high (OR, 6.7; P < 0.001) and low miR-16 expression (OR, 2.4; P ¼ 0.04) were independent markers for OS (Table II).

miR-16 and miR-143 Expression and p53 Mutations

In order to further investigate the reasons for differences in miR-16 expression levels between patients, we analyzed p53 mutations in 57 of 70 patients, 18 of whom (31.6%) had p53 mutations. No significant correlation was observed between mutation status (mutated vs. non-mutated) and miR-16 (P ¼ 0.41) or miR-143 (P ¼ 0.38) expression levels (Supplementary Fig. 2). Supplementary Figure 3 shows miR-16 expression levels according to the different types of p53 mutations found in our set of patients.

DISCUSSION

Although several reports indicate that miR-16 is a reference miRNA [20], it is downregulated in many tumors, including NSCLC [19,22,23]. In the present study, expression of miR-16 in normal lung tissue is not significantly different (P ¼ 0.9) from the expression levels in normal tissue from cancer patients. However, miR-16 was downregulated in the majority of patients although we also identified a small group of patients (11%) in whom it was upregulated and who had the worst prognosis. This is in line with recent findings by Bandi et al. [19], who have reported that most NSCLC tumors showed underexpression of miR-15 and miR-16, which allowed tumor cells to escape from miR-15/16 induction of cell cycle arrest through their target cyclin D1. In the same study, overexpression of miR-16 was detected in 26% of NSCLC tumors, in most of which the retinoblastoma gene was inactivated, allowing

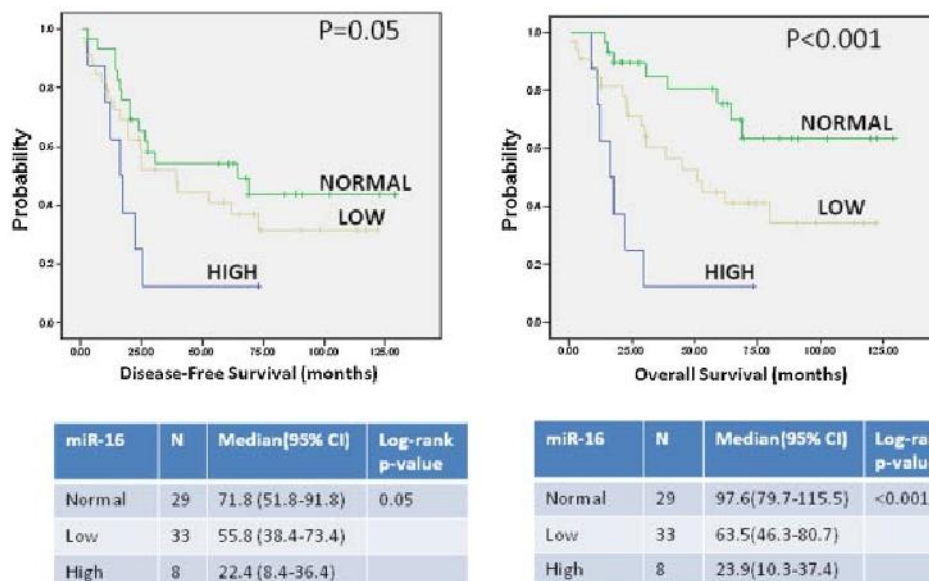


Fig. 2. Kaplan-Meier curves for disease-free and overall survival in 70 NSCLC patients grouped according to their miR-16 expression levels.

TABLE II. Multivariate Analyses of Disease-Free and Overall Survival Including All Factors With Univariate P-Value

	Disease-free survival			Overall survival		
	P-value	Odds ratio	95% CI	P-value	Odds ratio	95% CI
P53 mutation						
No		1		—	—	—
Yes	0.035	2.3	1.059-5.024			
miR-16 expression						
Normal		1			1	
High	0.001	8.120	2.5-26.5	<0.001	6.7	2.4-19.1
Low	0.1	—	—	0.038	2.4	1.1-5.6

Specifically, in the analysis for DFS, we have included smoking history, p53 mutations and miR-16. In the analysis for OS, we have included age and miR-16. The table shows only the significant variables.

tumor cells with high levels of miR-16 to escape cell cycle arrest [19]. miR-16 is also overexpressed in cervical cancer [24] and gliomas [25], and Bandi et al. [19] suggested a dual role for miR-16—as a tumor suppressor and an oncogenic miRNA. This dual role could shed light on our findings that two groups of patients—with low and high levels of miR-16—had a worse prognosis than those with levels similar to normal tissue. Along the same lines, at the clinical level, a recent study examining by microarray analysis the association between miRNA expression and recurrence in 77 stage I NSCLC patients found that miR-16 was overexpressed in patients who relapsed [26].

The dual role played by miRNAs [19,27] leads us to speculate that an individual patient's prognosis may depend less on whether the expression of a specific miRNA is high or low and more on the fact that the miRNA is dysregulated in comparison with normal tissue. In the present study, although patients can be classified in three molecular groups according to their miR-16 expression levels, from the clinical point of view, these three groups are in reality only two: those with good prognosis—with no alteration in miR-16 expression in tumor compared normal tissue; and those with poor prognosis—with either high or low miR-16 expression in tumor. miR-16 expression levels may thus be an additional risk factor to take into account when deciding on the potential benefit of adjuvant chemotherapy for resected patients, especially in stage I disease, where adjuvant treatment is not routine practice.

miRNA-based therapeutic strategies for the treatment of NSCLC have gained much attention in recent years. The rationale for developing miRNA therapeutics is based on the premise that aberrantly expressed miRNAs play key roles in the development of human disease, and that correcting these miRNA deficiencies by either antagonizing or restoring miRNA function may provide a therapeutic benefit. There are two principal strategies. One is directed toward a gain of function and aims to inhibit oncogenic miRNAs by using miRNA antagonists, such as anti-miRs and locked-nucleic acids, or antagomiRs. The other strategy is based on restoring the levels of tumor suppressor miRNAs in tumor tissues [28]. Specifically, the delivery of miRNA mimics in animal models of lung cancer has been explored by using let-7 [29,30] and, more recently, with miR-34a [31]. miR-16 may prove to be an attractive target for therapeutic intervention in lung cancer due to its important role in cell cycle control. In fact, synthetic miR-16 strongly inhibited the development of human prostate tumors in the bones of mice, with no notable side effects [32].

In our set of patients, no significant correlation was observed between mutation status and miR-16 or miR-143 expression levels. However, not all mutations have the same effect on the p53-Drosha interaction [18], and depending on where the mutation is located, it will have a greater or lesser effect (Supplementary Fig. 3). R175H and R273H mutations correlated with low Drosha activity, but other mutations, such as C135Y, had less effect [18]. We detected the R175H mutation in only three and the R273H mutation in only two

patients, which may explain the lack of correlation between miR-16 or miR-143 expression and p53 mutational status. Ideally, a larger number of patients would allow a correlation analysis to be performed between different types of mutations and miRNA expression.

In conclusion, our findings provide the first indication that miR-16 may be a prognostic marker for DFS and OS in NSCLC. These preliminary findings should be validated in an independent cohort. Since miR-16 are involved in the key p53 pathway, further studies to elucidate their mechanism of interaction and to validate the role of miR-16 as a prognostic marker could lead to the development of novel therapeutic strategies in NSCLC.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social [FIS-PI060087 and FIS-PI040123]; and Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica [SEPAR-2009]. Tania D'az is an FI fellow supported by AGAUR, Generalitat de Catalunya and to Fondo Social Europeo. Marc Campayo is supported by a "Premi Fi de Residencia Emili Letang" of the Hospital Clínic de Barcelona. Ciber de Respiratorio (Ciberes) is an initiative of ISCIII.

REFERENCES

1. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ: Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037-1057.
2. Burns JE, Baird MC, Clark LJ, et al.: Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993;67:1274-1284.
3. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, et al.: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Study Group. Oncogene* 1990;5:1603-1610.
4. Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, et al.: Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:2496-2503.
5. Fukuyama Y, Mitsudomi T, Sugio K, et al.: K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997;75:1125-1130.
6. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878.
7. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, et al.: Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993;53:1-4.
8. Huang C, Taki T, Adachi M, et al.: Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1998;16:2469-2477.

9. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, et al.: Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol* 1995;13:1893-1903.
10. McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, et al.: The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992;66:735-738.
11. Mitsudomi T, Lam S, Shirakusa T, et al.: Detection and sequencing of p53 gene mutations in bronchial biopsy samples in patients with lung cancer. *Chest* 1993;104:362-365.
12. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, et al.: Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Canc Inst* 1993;85:2018-2023.
13. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
14. He L, He X, Lim LP, et al.: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007;447:1130-1134.
15. He L, He X, Lowe SW, et al.: microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007;7:819-822.
16. Gallardo E, Navarro A, Vilas N, et al.: miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2009;30:1903-1909.
17. Hermeking H: p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007;12:414-418.
18. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al.: Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009;460:529-533.
19. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, et al.: miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2009;69:5553-5559.
20. Peltier HJ, Latham GJ: Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA (New York)* 2008;14:844-852.
21. Hothorn T, Lausen B: On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal* 2003;43:121-137.
22. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al.: miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 2005;204: 280-285.
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15524-15529.
24. Wang X, Tang S, Le S-Y, et al.: Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 2008;3:e2557.
25. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, et al.: Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol* 2010;20:539- 550.
26. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, et al.: Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res* 2009;70:36-45.
27. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J: miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep* 2009;10:400-405.
28. Bader AG, Brown D, Winkler M: The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010;70:7027-7030.
29. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, et al.: The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 2008;7:759-764.
30. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, et al.: Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2010;29:1580- 1587.
31. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, et al.: Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010;70:5923-5930.
32. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, et al.: Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 2010;18:181-18

DISCUSIÓN

En estos trabajos, mostramos el papel pronóstico en recaída de miR-34a y miR-16, en pacientes de CPNCP, tras cirugía potencialmente curativa.

El cáncer de pulmón no célula pequeña es un problema de salud pública prioritario, por tratarse de la causa de muerte por cáncer más frecuente en varones. A pesar, del esfuerzo en investigación, prevención y de nuevos tratamientos, esta enfermedad, sigue teniendo una supervivencia a 5 años, en torno al 13% y una tasa de recaída muy alta, incluso en estadios muy iniciales. Cuando la enfermedad recae tras la cirugía, en forma de enfermedad avanzada o metastásica, es incurable y de mal pronóstico a corto plazo⁶⁵. Estos hechos, hacen que siga siendo necesario el esfuerzo en encontrar marcadores precoces de recaída. En los últimos años, la administración de quimioterapia adyuvante, y en casos seleccionados la radioterapia, son prácticas asistenciales. Para aconsejar este tratamiento, nos basamos en la clasificación patológica del TNM (pTNM). Esto implica un sobretratamiento de pacientes que tienen menor riesgo de recaída y en otros casos, en los que la enfermedad está en un estado muy inicial, puede que estemos menospreciando una enfermedad biológicamente más agresiva. Esta cuestión es pertinente porque la toxicidad de los tratamientos con quimioterapia, tanto a corto como a largo plazo, es muy frecuente y en algunos casos muy grave, con riesgo vital.

Nos hemos centrado en el estudio de la vía de p53, porque se trata de un gen que codifica una proteína supresora de tumores, con probable valor pronóstico en CPNCP, existiendo mutaciones de esta proteína hasta en el 50% de los casos¹⁷⁷. En concreto en nuestra serie fue del 30%.

El descubrimiento de la existencia de una vía de regulación de expresión de proteínas a nivel postranscripcional, es decir la regulación llevada a cabo por los miRNAs, abrió un campo de investigación lleno de posibilidades. Se trata de moléculas capaces de regular la traducción de proteínas tanto en el tejido normal, como en el tumoral. La detección precoz de cambios en sus niveles normales, podría distinguir pacientes de

mayor riesgo de recaída y la posibilidad de estudiar dianas terapéuticas dirigidas a esta deficiencia.

Por todo esto, hemos analizado la importancia clínica que tienen los miRNAs de la vía de p53, en la evolución del CPNCP, tras cirugía potencialmente curativa. Nos hemos basado en una serie retrospectiva de pacientes 70 pacientes, que se trataron con cirugía curativa como primer y único tratamiento, entre Febrero de 1996 y Septiembre de 2002. Se eligió este periodo, porque el tiempo de seguimiento, en el momento del análisis era al menos de cinco años. Además, se trata de un grupo de pacientes, que no recibieron ningún tratamiento previo a la cirugía, que pudiera modificar los tejidos analizados y tampoco con intención adyuvante, ni con radioterapia ni con quimioterapia, que modificara la historia natural de esta enfermedad.

Dado que se trata de una serie retrospectiva con al menos 5 años de evolución, las muestras de tejido normal y tumoral pareadas de los pacientes eran muestras fijadas en parafina. Existen estudios que confirman que la expresión de miRNAs en el tejido fijado en parafina tiene buena correlación con el tejido congelado, sin que la fijación en parafina altere la estabilidad de los miRNAs^{208,209}. Es más, incluso se postula que los miRNAs se verían menos afectados por la autólisis y la fragmentación con la fijación en parafina²⁰⁹.

Nosotros observamos que miR-34a y miR-34b estaban significativamente infrarregulados, cuando comparamos el tejido tumoral con el tejido normal pareado de cada paciente. Tras este primer análisis, que mostraba que esta familia de miRNAs podía jugar algún papel en la tumorigénesis del CPNCP, procedimos a correlacionarlo con variables pronósticas como la recaída y la supervivencia global.

Nuestra serie, como ya comenté está formada por pacientes que tenían al menos cinco años de seguimiento, para permitirnos analizar los resultados cuando la mayoría de los pacientes ya hubieran presentado los eventos de recaída y supervivencia.

Mediante la utilización de MaxStat, paquete estadístico de R, que permite encontrar el mejor punto de corte en relación a una variable dependiente de tiempo, observamos que se establecieron tres grupos de pacientes, en función de la tasa de recaída: el

grupo con niveles bajos de miR34a, con un 67% de recaída, los que tenían niveles altos, con un 43% de recaída y los que tenían los niveles más altos con un 0% de recaída. Es decir, que la baja expresión de miR-34a en las muestras de tumor se correlacionó con alta tasa de recaída.

En el análisis univariado para riesgo de recaída, el estado mutacional de TP53, los niveles de miR-34a y el estadio IA vs el resto, se correlacionaron con probabilidad de recaída. En el análisis multivariado, la expresión de miR-34a, permanecía como factor independiente para recaída tumoral, lo que da más fuerza a la capacidad de miR-34a de distinguir pacientes de alto y bajo riesgo de recaída.

Por otro lado, que el estadiaje no se mantenga en el análisis multivariado, se puede explicar, porque la muestra es pequeña y la distribución de los estadios no es homogénea, siendo el 50% de los pacientes estadios I.

Para explicar la razón por la que miR-34a estaba bajo, nos planteamos dos posibilidades que TP53 estuviera mutado y/o que existiera alteración del estado de metilación de su promotor.

El análisis de estado de metilación de la región promotora de miR-34a, se llevó a cabo en 31 pacientes, el 64% presentaba un estado no metilado, el 26% un estado metilado/no metilado y en un 10 % estaba metilado. Los pacientes no metilados presentaban de forma significativa los niveles más altos de miR-34a, con respecto a los otros dos grupos.

La frecuencia de mutaciones de TP53 fue significativamente más alta en los pacientes con baja expresión de miR-34a, a pesar de no encontrar una relación directa significativa entre mutado/no mutado.

Cuando se analizó la relación entre el estado de metilación de MIRN34A y la expresión de miR-34a, en los pacientes sin mutaciones de TP53, se encontraron diferencias significativas entre los que estaban metilados versus los que no.

Por lo tanto, los niveles de miR-34a están modulados por el estado de metilación de la región promotora del gen MIRN34A.

Debido a que en nuestra serie observamos que p53 era marcador pronóstico de recaída, nos planteamos analizar que supervivencia libre de enfermedad tenían los pacientes con mutaciones de TP53 y niveles de expresión bajos de miR-34a. El subgrupo de pacientes con ambas condiciones presentó un pronóstico muy malo, indicando el sinergismo potencial de estos dos factores. Esto es muy interesante, porque como sabemos, la transcripción de miR-34 está directamente inducida por p53 en respuesta al estrés genotóxico y actúa en su vía celular promoviendo el arresto del ciclo celular o la apoptosis¹⁹⁷.

Los pacientes con niveles de expresión de miR-34a bajos, tuvieron mayor tasa de recaída que aquellos con alta expresión, indicando que diferencias interindividuales en la expresión de miR-34a pueden tener un impacto en la tasa de recaída de CPNCP.

De los pacientes que presentaron mutaciones de TP53 –un 30% en toda la serie- los que tenían mutaciones en el exón 5, tuvieron una tendencia a presentar menores niveles de miR-34a.

También encontramos una correlación entre el estado de metilación de la región promotora del gen MIRNA34 y los niveles de expresión de miR-34a.

Por otro lado, basándonos en que la maduración de miR-16 y miR-143, está regulada por P53 y, que en el caso de miR-16, se encuentra infra regulado en muchos tumores, analizamos los niveles de estos y su relación con el estado mutacional de TP53, en nuestra serie.

Encontramos que los niveles de miR-16 son significativamente diferentes entre el tejido normal y el tumoral. También los de miR-143.

miR-16 estaba infrarregulado en la mayoría de los pacientes, aunque identificamos un subgrupo de pacientes (11% de la serie), en los que miR-16 estaba suprarregulado, presentando estos el peor pronóstico.

Estos hallazgos van en consonancia con el estudio de Bandi *et al*¹⁹⁴, que observa que en un grupo de pacientes con CPNCP, miR-16 está suprarregulado y el gen de RB inactivado, lo que permite a las células escapar del arresto celular.

En base a los niveles de expresión de miR-16, en el grupo de pacientes con niveles de expresión de miR-34a alto, se diferenciaron 3 grupos pronósticos, aunque desde el punto de vista clínico se dividen en dos grupos, uno de buen pronóstico –aquellos que no presentaban alteración en la expresión de miR-16 comparando tejido tumoral y tejido normal- y el otro grupo de mal pronóstico –con niveles altos o bajos de miR-16-.

No encontramos relación entre el estado mutacional de TP53 y los niveles de expresión de miR-16, miR-143. Tampoco encontramos correlación entre la evolución clínica y los niveles de miR-143.

El papel dual que tienen algunos miRNAs, nos permite especular, que el pronóstico individual de un paciente puede depender menos de si la expresión específica de un miRNA es alta o baja, y más de que ese miRNA esté mal regulado en comparación con el tejido normal.

La familia de miR-34 es una diana directa de p53. Dado que funciones como el arresto del ciclo celular y la apoptosis son finales comunes de la activación de p53, puede que los miRNAs de la familia de miR-34 se comporten como mediadores de la supresión tumoral de P53.

miR-34a se ha relacionado con la regulación de algunos mRNAs con funciones en la respuesta al daño del DNA, como la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Algunos ejemplos son CDK 4/6, Ciclina E2, MET, Ciclina D1, N-MYC, SIRT1, NOTCH1 y NOTCH2¹⁹⁷.

Es llamativo, que cuando nos referimos a las dianas de miR-16, encontramos algunas dianas comunes como BCL2, Ciclina D1, además de otras dianas como MCL1 y WNT3A^{194,210}.

Esto nos permite también especular sobre que el papel que ejerce como tumor supresor p53, puede precisar como condicionante la integridad de la regulación postranscripcional llevada a cabo por estos miRNAs.

Además la interacción observada entre miR-34a y miR-16, puede reflejar que se trate de dos puntos de la misma vía de regulación postranscripcional secuenciales, siendo el punto de regulación más inicial y posiblemente necesario el de miR-34a.

La identificación de miR-34a y miR-16, como nuevos marcadores pronóstico en CPNCP, nos da una nueva herramienta para estimar el riesgo de recaída de los pacientes tras la cirugía. Además nuestros hallazgos abren la puerta al estudio del posible sinergismo entre miRNAs de la vía de p53 y la posibilidad futura de nuevas armas terapéuticas basadas en fármacos dirigidos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten indicar las conclusiones siguientes:

- ✓ Los miRNAs involucrados en la vía de p53 miR-34a y miR-16, son potenciales marcadores pronósticos en CPNCP tras cirugía potencialmente curativa.
- ✓ Los niveles de expresión de los miRNAs de la familia miR-34: miR-34a y miR-34b están infraregulados en tejido tumoral con respecto al tejido normal pareado.
- ✓ La baja expresión de miR-34a en tejido tumoral se correlaciona con una mayor tasa de recaída de la enfermedad.
- ✓ Los niveles de expresión de miR-34a se correlacionan con el estado de metilación de la región promotora del gen MIR34A.
- ✓ La presencia de mutaciones en el gen TP53 se relaciona con una mayor tasa de recaída de la enfermedad.
- ✓ Los pacientes que presentan TP53 mutado y a la vez miR-34a bajo son los que presentan una mayor tasa de recaída.
- ✓ Los niveles de expresión de los miRNAs miR-16 y miR-143, cuya maduración viene regulada por p53, están infraregulados en tejido tumoral con respecto al tejido normal pareado.
- ✓ La alteración de los niveles de miR-16, ya sea por infrarregulación o por suprarregulación, se relaciona con mayor riesgo de recaída.

- ✓ La interacción entre miR-34a y miR-16 muestra que miR-16 es capaz de subclasificar la cohorte de pacientes con niveles de miR-34a altos, en 3 grupos de riesgo:
 - a. Pacientes con niveles altos de miR-16 en tumor presentaban la menor SLE y SG.
 - b. Pacientes con niveles bajos de miR-16 en tumor presentaban una SLE y SG intermedia.
 - c. Pacientes que presentaban niveles normales de miR-16 son los que tenían mejor SLE y SG.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **2010**, caac.
- (2) Bray, F.; Tyczynski, J. E.; Parkin, D. M. Going up or coming down? The changing phases of the lung cancer epidemic from 1967 to 1999 in the 15 European Union countries. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **40**[1], 96-125. 2004.
- (3) Zhang, H.; Cai, B. The Impact of Tobacco on Lung Health in China. *Respirology* **2003**, **8**, 17-21.
- (4) Peto, R.; Chen, Z. M.; Boreham, J. Tobacco[Dash]the Growing Epidemic. *Nat Med* **1999**, **5**, 15-17.
- (5) Escuin, J. S. Lung Cancer in Spain. Current Epidemiology, Survival, and Treatment. *Arch. Bronconeumol.* **2009**, **45**, 341-348.
- (6) Franco, J.; Pérez-Hoyos, S.; Plaza, P. Changes in Lung-Cancer Mortality Trends in Spain. *Int. J. Cancer* **2002**, **97**, 102-105.
- (7) Reif, M. S.; Socinski, M. A.; Rivera, M. P. Evidence-Based Medicine in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Chest Med* **2000**, **21**, 107-20, ix.
- (8) Yesner, R. Pathogenesis and Pathology. *Clin Chest Med* **1993**, **14**, 17-30.
- (9) Hecht, S. S. Cigarette Smoking and Lung Cancer: Chemical Mechanisms and Approaches to Prevention. *Lancet Oncol.* **2002**, **3**, 461-469.
- (10) Tobacco Smoking. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* **1986**, **38**, 35-394.
- (11) Boyle, P. Cancer, Cigarette Smoking and Premature Death in Europe: a Review Including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* **1997**, **17**, 1-60.
- (12) Shapiro, J. A.; Jacobs, E. J.; Thun, M. J. Cigar Smoking in Men and Risk of Death From Tobacco-Related Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, **92**, 333-337.
- (13) Boffetta, P. Human Cancer From Environmental Pollutants: the Epidemiological Evidence. *Mutat. Res.* **2006**, **608**, 157-162.
- (14) Hackshaw, A. K.; Law, M. R.; Wald, N. J. The Accumulated Evidence on Lung Cancer and Environmental Tobacco Smoke. *BMJ* **1997**, **315**, 980-988.
- (15) Whitrow, M. J.; Smith, B. J.; Pilotto, L. S.; Pisaniello, D.; Nitschke, M. Environmental Exposure to Carcinogens Causing Lung Cancer: Epidemiological Evidence From the Medical Literature. *Respirology* **2003**, **8**, 513-521.
- (16) Lopez, M. J.; Pérez-Rojos, M.; Schiaffino, A.; Nebot, M.; Montes, A.; Ariza, C.; García, M.; Juárez, O.; Moncada, A.; Fernández, E. Mortality Attributable to Passive Smoking in Spain, 2002. *Tobacco Control* **2007**, **16**, 373-377.

- (17) Vineis, P. Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. *J. Natl Cancer Inst.* **2004**, *96*, 99-106.
- (18) Vineis, P.; Airoidi, L.; Veglia, F.; Olgiati, L.; Pastorelli, R.; Autrup, H.; Dunning, A.; Garte, S.; Gormally, E.; Hainaut, P.; Malaveille, C.; Matullo, G.; Peluso, M.; Overvad, K.; Tjonneland, A.; Clavel-Chapelon, F.; Boeing, H.; Krogh, V.; Palli, D.; Panico, S.; Tumino, R.; Bueno-De-Mesquita, B.; Peeters, P.; Berglund, G.; Hallmans, G.; Saracci, R.; Riboli, E. Environmental Tobacco Smoke and Risk of Respiratory Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Former Smokers and Never Smokers in the EPIC Prospective Study. *BMJ* **2005**, *330*, 277.
- (19) Li, S.; Pan, D.; Wang, G. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cooking Oil Fumes. *Arch. Environ. Health* **1994**, *49*, 119-122.
- (20) Seow, A. Fumes From Meat Cooking and Lung Cancer Risk in Chinese Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 1215-1221.
- (21) Molina, J. R.; Yang, P.; Cassivi, S. D.; Schild, S. E.; Adjei, A. A. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings* **2008**, *83*, 584-594.
- (22) Hwang, S. J.; Cheng, L. S.-C.; Lozano, G.; Amos, C. I.; Gu, X.; Strong, L. C. Lung Cancer Risk in Germline P53 Mutation Carriers: Association Between an Inherited Cancer Predisposition, Cigarette Smoking, and Cancer Risk. *Human Genetics* **2003**, *113*, 238-243.
- (23) Li, X.; Hemminki, K. Inherited Predisposition to Early Onset Lung Cancer According to Histological Type. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 451-457.
- (24) Bailey-Wilson, J. E. A Major Lung Cancer Susceptibility Locus Maps to Chromosome 6q23-25. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 460-474.
- (25) Amos, C. I.; Pinney, S. M.; Li, Y.; Kupert, E.; Lee, J.; de Andrade, M. A.; Yang, P.; Schwartz, A. G.; Fain, P. R.; Gazdar, A.; Minna, J.; Wiest, J. S.; Zeng, D.; Rothschild, H.; Mandal, D.; You, M.; Coons, T.; Gaba, C.; Bailey-Wilson, J. E.; Anderson, M. W. A Susceptibility Locus on Chromosome 6q Greatly Increases Lung Cancer Risk Among Light and Never Smokers. *Cancer Research* **2010**, *70*, 2359-2367.
- (26) Thorgeirsson, T. E.; Geller, F.; Sulem, P.; Rafnar, T.; Wiste, A.; Magnusson, K. P.; Manolescu, A.; Thorleifsson, G.; Stefansson, H.; Ingason, A.; Stacey, S. N.; Bergthorsson, J. T.; Thorlacius, S.; Gudmundsson, J.; Jonsson, T.; Jakobsdottir, M.; Saemundsdottir, J.; Olafsdottir, O.; Gudmundsson, L. J.; Bjornsdottir, G.; Kristjansson, K.; Skuladottir, H.; Isaksson, H. J.; Gudbjartsson, T.; Jones, G. T.; Mueller, T.; Gottsater, A.; Flex, A.; Aben, K. K. H.; de Vegt, F.; Mulders, P. F. A.; Isla, D.; Vidal, M. J.; Asin, L.; Saez, B.; Murillo, L.; Blondal, T.; Kolbeinsson, H.; Stefansson, J. G.; Hansdottir, I.; Runarsdottir, V.; Pola, R.; Lindblad, B.; van Rij, A. M.; Dieplinger, B.; Haltmayer, M.; Mayordomo, J. I.; Kiemeny, L. A.; Matthiasson, S. E.; Oskarsson, H.; Tyrfingsson, T.; Gudbjartsson, D. F.; Gulcher, J. R.; Jonsson, S.; Thorsteinsdottir, U.; Kong, A.; Stefansson, K. A Variant Associated With Nicotine Dependence, Lung Cancer and Peripheral Arterial Disease. *Nature* **2008**, *452*, 638-642.
- (27) Amos, C. I.; Wu, X.; Broderick, P.; Gorlov, I. P.; Gu, J.; Eisen, T.; Dong, Q.; Zhang, Q.; Gu, X.; Vijayakrishnan, J.; Sullivan, K.; Matakidou, A.; Wang, Y.; Mills, G.; Doheny, K.

Tsai, Y. Y.; Chen, W. V.; Shete, S.; Spitz, M. R.; Houlston, R. S. Genome-Wide Association Scan of Tag SNPs Identifies a Susceptibility Locus for Lung Cancer at 15q25.1. *Nat Genet* **2008**, *40*, 616-622.

- (28) Hung, R. J.; McKay, J. D.; Gaborieau, V.; Boffetta, P.; Hashibe, M.; Zaridze, D.; Mukeria, A.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Lissowska, J.; Rudnai, P.; Fabianova, E.; Mates, D.; Bencko, V.; Foretova, L.; Janout, V.; Chen, C.; Goodman, G.; Field, J. K.; Liloglou, T.; Xinarianos, G.; Cassidy, A.; McLaughlin, J.; Liu, G.; Narod, S.; Krokan, H. E.; Skorpen, F.; Elvestad, M. B.; Hveem, K.; Vatten, L.; Linseisen, J.; Clavel-Chapelon, F.; Vineis, P.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Lund, E.; Martinez, C.; Bingham, S.; Rasmuson, T.; Hainaut, P.; Riboli, E.; Ahrens, W.; Benhamou, S.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Holcatova, I.; Merletti, F.; Kjaerheim, K.; Agudo, A.; Macfarlane, G.; Talamini, R.; Simonato, L.; Lowry, R.; Conway, D. I.; Znaor, A.; Healy, C.; Zelenika, D.; Boland, A.; Delepine, M.; Foglio, M.; Lechner, D.; Matsuda, F.; Blanche, H.; Gut, I.; Heath, S.; Lathrop, M.; Brennan, P. A Susceptibility Locus for Lung Cancer Maps to Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes on 15q25. *Nature* **2008**, *452*, 633-637.
- (29) Samet, J. M. Radon and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **1989**, *81*, 745-758.
- (30) Belinsky, S. A.; Klinge, D. M.; Liechty, K. C.; March, T. H.; Kang, T.; Gilliland, F. D.; Sotnic, N.; Adamova, G.; Rusinova, G.; Telnov, V. Plutonium Targets the P16 Gene for Inactivation by Promoter Hypermethylation in Human Lung Adenocarcinoma. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1063-1067.
- (31) Samet, J. M.; Eradze, G. R. Radon and Lung Cancer Risk: Taking Stock at the Millenium. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108 Suppl 4*, 635-641.
- (32) Field, R. W.; Steck, D. J.; Smith, B. J.; Brus, C. P.; Fisher, E. L.; Neuberger, J. S.; Platz, C. E.; Robinson, R. A.; Woolson, R. F.; Lynch, C. F. Residential Radon Gas Exposure and Lung Cancer. *American Journal of Epidemiology* **2000**, *151*, 1091-1102.
- (33) SELIKOFF, I. J.; CHURG, J.; HAMMOND, E. C. Asbestos Exposure and Neoplasia. *JAMA* **1964**, *188*, 22-26.
- (34) Michele, C.; Robert, A. K.; Joseph, R. T. The pathogenesis of mesothelioma. *Seminars in oncology* 29[1], 2-17. 2002.
- (35) Mossman, B. T.; Bignon, J.; Corn, M.; Seaton, A.; Gee, J. B. Asbestos: Scientific Developments and Implications for Public Policy. *Science* **1990**, *247*, 294-301.
- (36) Hughes, J. M.; Weill, H. Potency Versus Importance in Fiber Pathogenicity. *Am. J Ind. Med* **1994**, *25*, 609-610.
- (37) van Loon, A. J.; Kant, I. J.; Swaen, G. M.; Goldbohm, R. A.; Kremer, A. M.; van den Brandt, P. A. Occupational Exposure to Carcinogens and Risk of Lung Cancer: Results From The Netherlands Cohort Study. *Occup. Environ. Med* **1997**, *54*, 817-824.
- (38) Camus, M.; Siemiatycki, J.; Meek, B. Nonoccupational Exposure to Chrysotile Asbestos and the Risk of Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2009**, *338*, 1565-1571.

- (39) Canver, C. C.; Memoli, V. A.; Vanderveer, P. L.; Dingivan, C. A.; Mentzer, R. M., Jr. Sex Hormone Receptors in Non-Small-Cell Lung Cancer in Human Beings. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1994**, *108*, 153-157.
- (40) Beattie, C. W.; Hansen, N. W.; Thomas, P. A. Steroid Receptors in Human Lung Cancer. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4206-4214.
- (41) Stabile, L. P. Human Non-Small Cell Lung Tumors and Cells Derived From Normal Lung Express Both Estrogen Receptor [Alpha] and [Beta] and Show Biological Responses to Estrogen. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2141-2150.
- (42) Patel, J. D.; Bach, P. B.; Kris, M. G. Lung Cancer in US Women. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **2004**, *291*, 1763-1768.
- (43) Beutner, K. R.; Tyring, S. Human Papillomavirus and Human Disease. *Am. J Med* **1997**, *102*, 9-15.
- (44) Wu, A. H.; Yu, M. C.; Thomas, D. C.; Pike, M. C.; Henderson, B. E. Personal and Family History of Lung Disease As Risk Factors for Adenocarcinoma of the Lung. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 7279-7284.
- (45) Wu, A. H.; Fontham, E. T.; Reynolds, P.; Greenberg, R. S.; Buffler, P.; Liff, J.; Boyd, P.; Henderson, B. E.; Correa, P. Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer Among Lifetime Nonsmoking Women in the United States. *Am. J Epidemiol.* **1995**, *141*, 1023-1032.
- (46) Osann, K. E. Lung Cancer in Women: the Importance of Smoking, Family History of Cancer, and Medical History of Respiratory Disease. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4893-4897.
- (47) Samet, J. M.; Humble, C. G.; Pathak, D. R. Personal and Family History of Respiratory Disease and Lung Cancer Risk. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1986**, *134*, 466-470.
- (48) Miller, Y. E.; Fain, P. Genetic Susceptibility to Lung Cancer. *Semin Respir Crit Care Med* **2003**, *24*, 197,204.
- (49) Liu, G.; Zhou, W.; Christiani, D. C. Molecular Epidemiology of Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Respir Crit Care Med* **2005**, *26*, 265,272.
- (50) Zheng, Z.; Bepler, G.; Cantor, A.; Haura, E. B. Small Tumor Size and Limited Smoking History Predicts Activated Epidermal Growth Factor Receptor in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer*. *Chest* **2005**, *128*, 308-316.
- (51) O'B, K. J.; Cox, G.; Swinson, D.; Richardson, D.; Edwards, J. G.; Lolljee, J.; Andi, A.; Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Gatter, K.; Harris, A. L.; Waller, D.; Jones, J. L. Towards a biological staging model for operable non-small cell lung cancer. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) *34*, S83-S89. 2001.
- (52) Fong, K. M.; Sekido, Y.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. Lung Cancer. 9: Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Thorax* **2003**, *58*, 892-900.

- (53) ROM, W. N.; HAY, J. G.; LEE, T. C.; JIANG, Y. I. X. I.; TCHOU-WONG, K. M. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1355-1367.
- (54) Fong, K. M.; Sekido, Y.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. Lung Cancer. 9: Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Thorax* **2003**, *58*, 892-900.
- (55) Field, J. K.; Youngson, J. H. The Liverpool Lung Project: a Molecular Epidemiological Study of Early Lung Cancer Detection. *European Respiratory Journal* **2002**, *20*, 464-479.
- (56) Palmisano, W. A.; Divine, K. K.; Saccomanno, G.; Gilliland, F. D.; Baylin, S. B.; Herman, J. G.; Belinsky, S. A. Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum. *Cancer Research* **2000**, *60*, 5954-5958.
- (57) Blackburn, E. H. Structure and Function of Telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569-573.
- (58) Collins, K. Mammalian Telomeres and Telomerase. *Current Opinion in Cell Biology* **2000**, *12*, 378-383.
- (59) Lingner, J.; Cech, T. R. Telomerase and Chromosome End Maintenance. *Current Opinion in Genetics & Development* **1998**, *8*, 226-232.
- (60) de Lange T.; Kim Sh, S. H.; Kaminker, P.; Campisi, J. Protection of Mammalian Telomeres, Aging and Cancer: in Search of a Happy Ending. *Oncogene* **2002**, *21*, 532-540.
- (61) Shay, J. W.; Pereira-Smith, O. M.; Wright, W. E. A Role for Both RB and P53 in the Regulation of Human Cellular Senescence. *Experimental Cell Research* **1991**, *196*, 33-39.
- (62) Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. Reversible Cellular Senescence: Implications for Immortalization of Normal Human Diploid Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3088-3092.
- (63) Smogorzewska, A.; de Lange T. Different Telomere Damage Signaling Pathways in Human and Mouse Cells. *EMBO J* **2002**, *21*, 4338-4348.
- (64) Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **2005**, *55*, 74-108.
- (65) Mountain, C. F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* **1997**, *111*, 1710-1717.
- (66) Vallières, E.; Shepherd, F. A.; Crowley, J.; Van Houtte, P.; Postmus, P. E.; Carney, D.; Chansky, K.; Shaikh, Z.; Goldstraw, P.; on Behalf of the International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals Regarding the Relevance of TNM in the Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **2009**, *4*.
- (67) Johnson, B. E.; Grayson, J.; Makuch, R. W.; Linnoila, R. I.; Anderson, M. J.; Cohen, M. H.; Glatstein, E.; Minna, J. D.; Ihde, D. C. Ten-Year Survival of Patients With Small-Cell

Lung Cancer Treated With Combination Chemotherapy With or Without Irradiation. *Journal of Clinical Oncology* **1990**, *8*, 396-401.

- (68) De Vita VT Jr. Small Cell Lung Cancer. Hellman S, Rosenberg SA. Principles And Practice of Oncology 7 Th Edit. 2005. Philadelphia,PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- (69) Travis WD. World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics:tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Brambilla E, Muller-Hermelink HK Harris CC. 2004. IARC press.
- (70) Funai, K.; Yokose, T.; Ishii, G. i.; Araki, K.; Yoshida, J.; Nishimura, M.; Nagai, K.; Nishiwaki, Y.; Ochiai, A. Clinicopathologic Characteristics of Peripheral Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *The American Journal of Surgical Pathology* **2003**, *27*.
- (71) Tomashefski, J. F., Jr.; Connors, A. F., Jr.; Rosenthal, E. S.; Hsiue, I. L.; Churg, A.; Johnston, W. H.; Stulbarg, M.; Terasaki, H.; Niki, T.; Matsuno, Y.; Yamada, T.; Maeshima, A.; Asamura, H.; Hayabuchi, N.; Hirohashi, S.; Miyoshi, T.; Satoh, Y.; Okumura, S.; Nakagawa, K.; Shirakusa, T.; Tsuchiya, E.; Ishikawa, Y.; Nakatani, Y.; Kitamura, H.; Inayama, Y.; Kamijo, S.; Nagashima, Y.; Shimoyama, K.; Nakamura, N.; Sano, J.; Ogawa, N.; Shibagaki, T.; Resl, M.; Mark, E. J.; Travis, W. D.; Linnoila, R. I.; Tsokos, M. G.; Hitchcock, C. L.; Cutler, G. B., Jr.; Nieman, L.; Chrousos, G.; Pass, H.; Doppman, J. Peripheral Vs Central Squamous Cell Carcinoma of the Lung. A Comparison of Clinical Features, Histopathology, and Survival Small Cell Squamous and Mixed Small Cell Squamous--Small Cell Anaplastic Carcinomas of the Lung Adenocarcinoma With Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components: Clinicopathological Features, Subclassification by Extent of Invasive Foci, and Immunohistochemical Characterization Early-Stage Lung Adenocarcinomas With a Micropapillary Pattern, a Distinct Pathologic Marker for a Significantly Poor Prognosis Pulmonary Adenocarcinomas of the Fetal Lung Type: a Clinicopathologic Study Indicating Differences in Histology, Epidemiology, and Natural History of Low-Grade and High-Grade Forms Neuroendocrine Tumors of the Lung With Proposed Criteria for Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma. An Ultrastructural, Immunohistochemical, and Flow Cytometric Study of 35 Cases. *Arch. Pathol. Lab Med* **1990**, *114*, 468-474.
- (72) Quint, L. E.; Tummala, S.; Brisson, L. J.; Francis, I. R.; Krupnick, A. S.; Kazerooni, E. A.; Iannettoni, M. D.; Whyte, R. I.; Orringer, M. B. Distribution of Distant Metastases From Newly Diagnosed Non-Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* **1996**, *62*, 246-250.
- (73) Churg, A.; Johnston, W. H.; Stulbarg, M.; Terasaki, H.; Niki, T.; Matsuno, Y.; Yamada, T.; Maeshima, A.; Asamura, H.; Hayabuchi, N.; Hirohashi, S.; Miyoshi, T.; Satoh, Y.; Okumura, S.; Nakagawa, K.; Shirakusa, T.; Tsuchiya, E.; Ishikawa, Y.; Nakatani, Y.; Kitamura, H.; Inayama, Y.; Kamijo, S.; Nagashima, Y.; Shimoyama, K.; Nakamura, N.; Sano, J.; Ogawa, N.; Shibagaki, T.; Resl, M.; Mark, E. J.; Travis, W. D.; Linnoila, R. I.; Tsokos, M. G.; Hitchcock, C. L.; Cutler, G. B., Jr.; Nieman, L.; Chrousos, G.; Pass, H.; Doppman, J. Small Cell Squamous and Mixed Small Cell Squamous--Small Cell Anaplastic Carcinomas of the Lung Adenocarcinoma With Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components: Clinicopathological Features, Subclassification by Extent of Invasive Foci, and Immunohistochemical Characterization Early-Stage Lung Adenocarcinomas With a Micropapillary Pattern, a Distinct Pathologic Marker for a Significantly Poor Prognosis Pulmonary Adenocarcinomas of the Fetal Lung Type: a

Clinicopathologic Study Indicating Differences in Histology, Epidemiology, and Natural History of Low-Grade and High-Grade Forms Neuroendocrine Tumors of the Lung With Proposed Criteria for Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma. An Ultrastructural, Immunohistochemical, and Flow Cytometric Study of 35 Cases. *Am. J Surg. Pathol.* **1980**, *4*, 255-263.

- (74) Terasaki, H.; Niki, T.; Matsuno, Y.; Yamada, T.; Maeshima, A.; Asamura, H.; Hayabuchi, N.; Hirohashi, S. Lung Adenocarcinoma With Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components: Clinicopathological Features, Subclassification by Extent of Invasive Foci, and Immunohistochemical Characterization. *Am. J Surg. Pathol.* **2003**, *27*, 937-951.
- (75) Sidhu, G. S.; Wieczorek, R.; Cassai, N. D.; Zhu, C. C. The Concept of Bronchioloalveolar Cell Adenocarcinoma: Redefinition, A Critique of the 1999 WHO Classification, and an Ultrastructural Analysis of 155 Cases. *International Journal of Surgical Pathology* **2003**, *11*, 89-99.
- (76) Travis, W. D.; Brambilla, E.; Noguchi, M.; Nicholson, A. G.; Geisinger, K. R.; Yatabe, Y.; Beer, D. G.; Powell, C. A.; Riely, G. J.; Van Schil, P. E.; Garg, K.; Austin, J. H.; Asamura, H.; Rusch, V. W.; Hirsch, F. R.; Scagliotti, G.; Mitsudomi, T.; Huber, R. M.; Ishikawa, Y.; Jett, J.; Sanchez-Cespedes, M.; Sculier, J. P.; Takahashi, T.; Tsuboi, M.; Vansteenkiste, J.; Wistuba, I.; Yang, P. C.; Aberle, D.; Brambilla, C.; Flieder, D.; Franklin, W.; Gazdar, A.; Gould, M.; Hasleton, P.; Henderson, D.; Johnson, B.; Johnson, D.; Kerr, K.; Kuriyama, K.; Lee, J. S.; Miller, V. A.; Petersen, I.; Roggli, V.; Rosell, R.; Saijo, N.; Thunnissen, E.; Tsao, M.; Yankelewitz, D. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac. Oncol* **2011**, *6*, 244-285.
- (77) Stenberg S. Stenberg's diagnostic surgical pathology(4^a ed.). 2004. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- (78) Travis, W. D.; Linnoila, R. I.; Tsokos, M. G.; Hitchcock, C. L.; Cutler, G. B., Jr.; Nieman, L.; Chrousos, G.; Pass, H.; Doppman, J. Neuroendocrine Tumors of the Lung With Proposed Criteria for Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma. An Ultrastructural, Immunohistochemical, and Flow Cytometric Study of 35 Cases. *Am. J Surg. Pathol.* **1991**, *15*, 529-553.
- (79) Claudia, Y. C.; Mary, L. O.; Roberto, B.; Linda, K. G.; Helmuth, H. P.; Susan, P.; Phillip, T. C.; Jae, Y. R. Relationship between epstein-barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: A clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Human pathology* 32[8], 863-872. 2001.
- (80) Cavazza, A.; Colby, T. V.; Tsokos, M.; Rush, W.; Travis, W. D. Lung Tumors With a Rhabdoid Phenotype. *Am. J Clin Pathol.* **1996**, *105*, 182-188.
- (81) Scagliotti GV. Symptoms, signs and staging of lungcancer. 2001. 17(2), 86-119. *Eur Respir Mon.*
- (82) Beckles, M. A.; Spiro, S. G.; Colice, G. L.; Rudd, R. M. Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer*. *Chest* **2003**, *123*, 97S-104S.

- (83) Silvestri, G. A.; Littenberg, B.; Colice, G. L. The Clinical Evaluation for Detecting Metastatic Lung Cancer. A Meta-Analysis. *Am. J Respir. Crit Care Med* **1995**, *152*, 225-230.
- (84) Patel, A. M.; Davila, D. G.; Peters, S. G. Paraneoplastic Syndromes Associated With Lung Cancer. *Mayo Clin Proc.* **1993**, *68*, 278-287.
- (85) Gamez, C.; Rosell, R.; Fernandez, A.; Andia, E.; Arnaiz, M. D.; Cardenal, F.; Lorenzo, C. PET/CT Fusion Scan in Lung Cancer: Current Recommendations and Innovations. *J Thorac. Oncol* **2006**, *1*, 74-77.
- (86) Lardinois, D.; De Leyn, P.; Van Schil, P.; Porta, R. R.; Waller, D.; Passlick, B.; Zielinski, M.; Junker, K.; Rendina, E. A.; Ris, H. B.; Hasse, J.; Detterbeck, F.; Lerut, T.; Weder, W. ESTS Guidelines for Intraoperative Lymph Node Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2006**, *30*, 787-792.
- (87) Mountain, C. F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* **1997**, *111*, 1710-1717.
- (88) Rami, P. R. [New TNM Classification for Lung Cancer]. *Arch. Bronconeumol.* **2009**, *45*, 159-161.
- (89) No authors listed Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: a Meta-Analysis Using Updated Data on Individual Patients From 52 Randomised Clinical Trials. *BMJ* **1995**, *311*, 899-909.
- (90) Arriagada R, e. a. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Completely Resected Non Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2004**, *350*, 351-360.
- (91) Arriagada, R.; Dunant, A.; Pignon, J. P.; Bergman, B.; Chabowski, M.; Grunenwald, D.; Kozlowski, M.; Le P+[®]choux, C. +.; Pirker, R.; Pinel, M. I. S.; Tarayre, M. I.; Le Chevalier, T. Long-Term Results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial Evaluating Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Resected Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 35-42.
- (92) Douillard, J. Y.; Rosell, R.; De Lena, M.; Carpagnano, F.; Ramlau, R.; Gonzβles-Larriba, J. L.; Grodzki, T.; Pereira, J. R.; Le Groumellec, A.; Lorusso, V.; Clary, C.; Torres, A. J.; Dahabreh, J.; Souquet, P. J.; Astudillo, J.; Fournel, P.; Artal-Cortes, A.; Jassem, J.; Koubkova, L.; His, P.; Riggi, M.; Hurteloup, P. Adjuvant Vinorelbine Plus Cisplatin Versus Observation in Patients With Completely Resected Stage IB-IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a Randomised Controlled Trial. *The Lancet Oncology* **2006**, *7*, 719-727.
- (93) Winton, T.; Livingston, R.; Johnson, D.; Rigas, J.; Johnston, M.; Butts, C.; Cormier, Y.; Goss, G.; Incelet, R.; Vallieres, E.; Fry, W.; Bethune, D.; Ayoub, J.; Ding, K.; Seymour, L.; Graham, B.; Tsao, M. S.; Gandara, D.; Kesler, K.; Demmy, T.; Shepherd, F. Vinorelbine Plus Cisplatin Vs. Observation in Resected Non Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352*, 2589-2597.
- (94) Strauss, G. M.; Herndon, J. E.; Maddaus, M. A.; Johnstone, D. W.; Johnson, E. A.; Harpole, D. H.; Gillenwater, H. H.; Watson, D. M.; Sugarbaker, D. J.; Schilsky, R. L.; Vokes, E. E.; Green, M. R. Adjuvant Paclitaxel Plus Carboplatin Compared With

Observation in Stage IB Non-Small-Cell Lung Cancer: CALGB 9633 With the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 5043-5051.

- (95) Felip, E.; Rosell, R.; Maestre, J. A.; Rodriguez-Paniagua, J. M.; Morín, T.; Astudillo, J.; Alonso, G.; Borro, J. M.; Gonzalez-Larriba, J. L.; Torres, A.; Camps, C.; Guijarro, R.; Isla, D.; Aguilar, R.; Alberola, V.; Padilla, J.; Sánchez-Palencia, A.; Sánchez, J. J.; Hermosilla, E.; Massuti, B. Preoperative Chemotherapy Plus Surgery Versus Surgery Plus Adjuvant Chemotherapy Versus Surgery Alone in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 3138-3145.
- (96) Pignon, J. P.; Tribodet, H. +.; Scagliotti, G. V.; Douillard, J. Y.; Shepherd, F. A.; Stephens, R. J.; Dunant, A.; Torri, V.; Rosell, R.; Seymour, L.; Spiro, S. G.; Rolland, E.; Fossati, R.; Aubert, D.; Ding, K.; Waller, D.; Le Chevalier, T. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 3552-3559.
- (97) Olausson, K. A.; Dunant, A.; Fouret, P.; Brambilla, E.; Andr[®], F.; Haddad, V.; Taranchon, E.; Filipits, M.; Pirker, R.; Popper, H. H.; Stahel, R.; Sabatier, L.; Pignon, J. P.; Tursz, T.; Le Chevalier, T.; Soria, J. C. DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *New England Journal of Medicine* **2006**, *355*, 983-991.
- (98) Zheng, Z.; Chen, T.; Li, X.; Haura, E.; Sharma, A.; Bepler, G. DNA Synthesis and Repair Genes RRM1 and ERCC1 in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 800-808.
- (99) Vokes, E. E.; Herndon, J. E.; Kelley, M. J.; Cicchetti, M. G.; Ramnath, N.; Neill, H.; Atkins, J. N.; Watson, D. M.; Akerley, W.; Green, M. R. Induction Chemotherapy Followed by Chemoradiotherapy Compared With Chemoradiotherapy Alone for Regionally Advanced Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: Cancer and Leukemia Group B. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, 1698-1704.
- (100) Gandara, D.; Narayan, S.; Lara, P. N.; Goldberg, Z.; Davies, A.; Lau, D. H. M.; Mack, P.; Gumerlock, P.; Vijayakumar, S. Integration of Novel Therapeutics into Combined Modality Therapy of Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 5057s-5062s.
- (101) Gaspar, L. E.; Chansky, K.; Albain, K. S.; Vallieres, E.; Rusch, V.; Crowley, J. J.; Livingston, R. B.; Gandara, D. R. Time From Treatment to Subsequent Diagnosis of Brain Metastases in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Review by the Southwest Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23*, 2955-2961.
- (102) Woods, R. L.; Williams, C. J.; Levi, J.; Page, J.; Bell, D.; Byrne, M.; Kerestes, Z. L. A Randomised Trial of Cisplatin and Vindesine Versus Supportive Care Only in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Br J Cancer* **1990**, *61*, 608-611.
- (103) Cellerino, R.; Tummarello, D.; Guidi, F.; Isidori, P.; Raspugli, M.; Biscottini, B.; Fatati, G. A Randomized Trial of Alternating Chemotherapy Versus Best Supportive Care in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **1991**, *9*, 1453-1461.

- (104) Helsing, M.; Bergman, B.; Thaning, L.; Hero, U. Quality of life and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving supportive care plus chemotherapy with carboplatin and etoposide or supportive care only. A multicentre randomised phase III trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **34**[7], 1036-1044. 1998.
- (105) BMJ 1995 Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: a Meta-Analysis Using Updated Data on Individual Patients From 52 Randomised Clinical Trials. *BMJ* **1995**, *311*, 899-909.
- (106) Spiro, S. G.; Rudd, R. M.; Souhami, R. L.; Brown, J.; Fairlamb, D. J.; Gower, N. H.; Maslove, L.; Milroy, R.; Napp, V.; Parmar, M. K. B.; Peake, M. D.; Stephens, R. J.; Thorpe, H.; Waller, D. A.; West, P. Chemotherapy Versus Supportive Care in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Improved Survival Without Detriment to Quality of Life. *Thorax* **2004**, *59*, 828-836.
- (107) Le Chevalier, T.; Brisingand, D.; Douillard, J. Y.; Pujol, J. L.; Alberola, V.; Monnier, A.; Riviere, A.; Lianes, P.; Chomy, P.; Cigolari, S. Randomized Study of Vinorelbine and Cisplatin Versus Vindesine and Cisplatin Versus Vinorelbine Alone in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a European Multicenter Trial Including 612 Patients. *Journal of Clinical Oncology* **1994**, *12*, 360-367.
- (108) Georgoulas, V.; Ardavanis, A.; Agelidou, A.; Agelidou, M.; Chandrinos, V.; Tsaroucha, E.; Toumbis, M.; Kouroussis, C.; Syrigos, K.; Polyzos, A.; Samaras, N.; Papakotoulas, P.; Christofilakis, C.; Ziras, N.; Alegakis, A. Docetaxel Versus Docetaxel Plus Cisplatin As Front-Line Treatment of Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 2602-2609.
- (109) Schiller, J. H.; Harrington, D.; Belani, C. P.; Langer, C.; Sandler, A.; Krook, J.; Zhu, J.; Johnson, D. H. Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2002**, *346*, 92-98.
- (110) Azzoli, C. G.; Baker, S.; Temin, S.; Pao, W.; Aliff, T.; Brahmer, J.; Johnson, D. H.; Laskin, J. L.; Masters, G.; Milton, D.; Nordquist, L.; Pfister, D. G.; Piantadosi, S.; Schiller, J. H.; Smith, R.; Smith, T. J.; Strawn, J. R.; Trent, D.; Giaccone, G. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 6251-6266.
- (111) Alberola, V.; Camps, C.; Provencio, M.; Isla, D.; Rosell, R.; Vadell, C.; Bover, I.; Ruiz-Casado, A.; Azagra, P.; Jimenez, U.; González-Larriba, J. L.; Diz, P.; Cardenal, F.; Artal, A.; Carrato, A.; Morales, S.; Sánchez, J. J.; de las Peñas, R.; Felip, E.; López-Vivanco, G. Cisplatin Plus Gemcitabine Versus a Cisplatin-Based Triplet Versus Nonplatinum Sequential Doublets in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Spanish Lung Cancer Group Phase III Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 3207-3213.
- (112) Kosmidis, P.; Mylonakis, N.; Nicolaidis, C.; Kalophonos, C.; Samantas, E.; Boukovinas, J.; Fountzilas, G.; Skarlos, D.; Economopoulos, T.; Tsavdaridis, D.; Papakostas, P.; Bacoyiannis, C.; Dimopoulos, M. Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Gemcitabine Plus Paclitaxel in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20*, 3578-3585.

- (113) Gridelli, C.; Gallo, C.; Shepherd, F. A.; Illiano, A.; Piantedosi, F.; Robbiati, S. F.; Manzione, L.; Barbera, S.; Frontini, L.; Veltri, E.; Findlay, B.; Cigolari, S.; Myers, R.; Ianniello, G. P.; Gebbia, V.; Gasparini, G.; Fava, S.; Hirsh, V.; Bezjak, A.; Seymour, L.; Perrone, F. Gemcitabine Plus Vinorelbine Compared With Cisplatin Plus Vinorelbine or Cisplatin Plus Gemcitabine for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 3025-3034.
- (114) D'Addario, G.; Pintilie, M.; Leighl, N. B.; Feld, R.; Cerny, T.; Shepherd, F. A. Platinum-Based Versus Non-Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of the Published Literature. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23*, 2926-2936.
- (115) Sandler, A.; Gray, R.; Perry, M. C.; Brahmer, J.; Schiller, J. H.; Dowlati, A.; Lilienbaum, R.; Johnson, D. H. Paclitaxel-Carboplatin Alone or With Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2006**, *355*, 2542-2550.
- (116) Scagliotti, G.; Brodowicz, T.; Shepherd, F. A.; Zielinski, C.; Vansteenkiste, J.; Manegold, C.; Simms, L.; Fossella, F.; Sugarman, K.; Belani, C. P. Treatment-by-Histology Interaction Analyses in Three Phase III Trials Show Superiority of Pemetrexed in Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac. Oncol* **2011**, *6*, 64-70.
- (117) Scagliotti, G. V.; Parikh, P.; von Pawel, J.; Biesma, B.; Vansteenkiste, J.; Manegold, C.; Serwatowski, P.; Gatzemeier, U.; Digumarti, R.; Zukin, M.; Lee, J. S.; Mellempgaard, A.; Park, K.; Patil, S.; Rolski, J.; Goksel, T.; De Marinis, F.; Simms, L.; Sugarman, K. P.; Gandara, D. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 3543-3551.
- (118) Maemondo, M.; Inoue, A.; Kobayashi, K.; Sugawara, S.; Oizumi, S.; Isobe, H.; Gemma, A.; Harada, M.; Yoshizawa, H.; Kinoshita, I.; Fujita, Y.; Okinaga, S.; Hirano, H.; Yoshimori, K.; Harada, T.; Ogura, T.; Ando, M.; Miyazawa, H.; Tanaka, T.; Saijo, Y.; Hagiwara, K.; Morita, S.; Nukiwa, T. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine* **2010**, *362*, 2380-2388.
- (119) Thatcher, N. Gefitinib Plus Best Supportive Care in Previously Treated Patients With Refractory Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From a Randomised, Placebo-Controlled, Multicentre Study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* **2005**, *366*, 1527-1537.
- (120) Bonomi, P. Erlotinib: a New Therapeutic Approach for Non-Small Cell Lung Cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 1395-1401.
- (121) Giaccone, G.; Herbst, R. S.; Manegold, C.; Scagliotti, G.; Rosell, R.; Miller, V.; Natale, R. B.; Schiller, J. H.; von Pawel, J.; Pluzanska, A.; Gatzemeier, U.; Grous, J.; Ochs, J. S.; Averbuch, S. D.; Wolf, M. K.; Rennie, P.; Fandi, A.; Johnson, D. H. Gefitinib in Combination With Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial-INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 777-784.

- (122) Herbst, R. S.; Giaccone, G.; Schiller, J. H.; Natale, R. B.; Miller, V.; Manegold, C.; Scagliotti, G.; Rosell, R.; Oliff, I.; Reeves, J. A.; Wolf, M. K.; Krebs, A. D.; Averbuch, S. D.; Ochs, J. S.; Grous, J.; Fandi, A.; Johnson, D. H. Gefitinib in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial-INTACT 2. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 785-794.
- (123) Herbst, R. S. TRIBUTE: a Phase III Trial of Erlotinib Hydrochloride (OSI-774) Combined With Carboplatin and Paclitaxel Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 5892-5899.
- (124) Gatzemeier, U.; Pluzanska, A.; Szczesna, A.; Kaukel, E.; Roubec, J.; De Rosa, F.; Milanowski, J.; Karnicka-Mlodkowski, H.; Pesek, M.; Serwatowski, P.; Ramlau, R.; Janaskova, T.; Vansteenkiste, J.; Strausz, J.; Manikhas, G. M.; von Pawel, J. Phase III Study of Erlotinib in Combination With Cisplatin and Gemcitabine in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: The Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, 1545-1552.
- (125) Paez, J. G. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation With Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- (126) Gazdar, A. F. Activating and Resistance Mutations of EGFR in Non-Small-Cell Lung Cancer: Role in Clinical Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncogene* **0 AD**, *28*, S24-S31.
- (127) Lynch, T. J. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2129-2139.
- (128) Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Thongprasert, S.; Yang, C. H.; Chu, D. T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P.; Han, B.; Margono, B.; Ichinose, Y.; Nishiwaki, Y.; Ohe, Y.; Yang, J. J.; Chewaskulyong, B.; Jiang, H.; Duffield, E. L.; Watkins, C. L.; Armour, A. A.; Fukuoka, M. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 947-957.
- (129) Ciuleanu, T.; Brodowicz, T.; Zielinski, C.; Kim, J. H.; Krzakowski, M.; Laack, E.; Wu, Y. L.; Bover, I.; Begbie, S.; Tzekova, V.; Cucevic, B.; Pereira, J. R.; Yang, S. H.; Madhavan, J.; Sugarman, K. P.; Peterson, P.; John, W. J.; Krejcy, K.; Belani, C. P. Maintenance Pemetrexed Plus Best Supportive Care Versus Placebo Plus Best Supportive Care for Non-Small-Cell Lung Cancer: a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Study. *Lancet* **2009**, *374*, 1432-1440.
- (130) Cappuzzo, F.; Ciuleanu, T.; Stelmakh, L.; Cicenias, S.; Szczesna, A.; Juhasz, E.; Esteban, E.; Molinier, O.; Brugger, W.; Melezinek, I.; Klingelschmitt, G.; Klughammer, B.; Giaccone, G. Erlotinib As Maintenance Treatment in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: a Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Phase 3 Study. *Lancet Oncol* **2010**, *11*, 521-529.
- (131) Feld, R.; Abratt, R.; Graziano, S.; Jassem, J.; Lacquet, L.; Ninane, V.; Paesmans, M.; Rocmans, P.; Schiepers, C.; Stahel, R.; Stephens, R. Pretreatment Minimal Staging and Prognostic Factors for Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* **1997**, *17 Suppl 1*, S3-10.

- (132) Pfister, D. G.; Johnson, D. H.; Azzoli, C. G.; Sause, W.; Smith, T. J.; Baker, S.; Olak, J.; Stover, D.; Strawn, J. R.; Turrisi, A. T.; Somerfield, M. R. American Society of Clinical Oncology Treatment of Unresectable Non-Small-Cell Lung Cancer Guideline: Update 2003. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 330-353.
- (133) Ball, D.; Smith, J.; Wirth, A.; Manus, M. M. Failure of T stage to predict survival in patients with non-small-cell lung cancer treated by radiotherapy with or without concomitant chemotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **54**[4], 1007-1013. 2002.
- (134) Rami-Porta, R.; Ball, D.; Crowley, J.; Giroux, D. J.; Jett, J.; Travis, W. D.; Tsuboi, M.; Vallieres, E.; Goldstraw, P. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the T Descriptors in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac. Oncol* **2007**, *2*, 593-602.
- (135) Finkelstein, D. M.; Ettinger, D. S.; Ruckdeschel, J. C. Long-Term Survivors in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* **1986**, *4*, 702-709.
- (136) Albain, K. S.; Crowley, J. J.; LeBlanc, M.; Livingston, R. B. Survival Determinants in Extensive-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer: the Southwest Oncology Group Experience. *Journal of Clinical Oncology* **1991**, *9*, 1618-1626.
- (137) Paesmans, M.; Sculier, J. P.; Libert, P.; Bureau, G.; Dabouis, G.; Thiriaux, J.; Michel, J.; Van Cutsem, O.; Sergysels, R.; Mommen, P. Prognostic Factors for Survival in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Univariate and Multivariate Analyses Including Recursive Partitioning and Amalgamation Algorithms in 1,052 Patients. The European Lung Cancer Working Party. *Journal of Clinical Oncology* **1995**, *13*, 1221-1230.
- (138) Hoang, T.; Xu, R.; Schiller, J. H.; Bonomi, P.; Johnson, D. H. Clinical Model to Predict Survival in Chemonaive Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Third-Generation Chemotherapy Regimens Based on Eastern Cooperative Oncology Group Data. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23*, 175-183.
- (139) Ginsberg, R. J.; Rubinstein, L. V. Randomized Trial of Lobectomy Versus Limited Resection for T1 N0 Non-Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* **1995**, *60*, 615-623.
- (140) Gridelli, C.; Aapro, M.; Ardizzoni, A.; Balducci, L.; De Marinis, F.; Kelly, K.; Le Chevalier, T.; Manegold, C.; Perrone, F.; Rosell, R.; Shepherd, F.; De Petris, L.; Di Maio, M.; Langer, C. Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer in the Elderly: Results of an International Expert Panel. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23*, 3125-3137.
- (141) Tammemagi, C. M.; Neslund-Dudas, C.; Simoff, M.; Kvale, P. Impact of Comorbidity on Lung Cancer Survival. *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 792-802.
- (142) Birim, Í.; Maat, A. P. W. M.; Kappetein, A. P.; van Meerbeeck, J. P.; Damhuis, R. A. M.; Bogers, A. J. J. C. Validation of the Charlson Comorbidity Index in Patients With Operated Primary Non-Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2003**, *23*, 30-34.

- (143) Ambrogi, V.; Pompeo, E.; Elia, S.; Pistolese, G. R.; Mineo, T. C. The Impact of Cardiovascular Comorbidity on the Outcome of Surgery for Stage I and II Non-Small-Cell Lung Cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2003**, *23*, 811-817.
- (144) Tammemagi, C. M.; Neslund-Dudas, C.; Simoff, M.; Kvale, P. Smoking and Lung Cancer Survival: the Role of Comorbidity and Treatment. *Chest* **2004**, *125*, 27-37.
- (145) Thomas, L.; Doyle, L. A.; Edelman, M. J. Lung Cancer in Women*. *Chest* **2005**, *128*, 370-381.
- (146) Patel, J. D. Lung Cancer in Women. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23*, 3212-3218.
- (147) Qingyi, W.; Lie, C.; Amos, C. I.; Wang, L. E.; Zhaozheng, G.; Hong, W. K.; Spitz, M. R. Repair of Tobacco Carcinogen-Induced DNA Adducts and Lung Cancer Risk: a Molecular Epidemiologic Study. *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, *92*, 1764-1772.
- (148) Alexiou, C.; Patrick Onyeaka, C. V.; Beggs, D.; Akar, R.; Beggs, L.; Salama, F. D.; Duffy, J. P.; Ellis Morgan, W. Do Women Live Longer Following Lung Resection for Carcinoma? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2002**, *21*, 319-325.
- (149) Minami, H.; Yoshimura, M.; Miyamoto, Y.; Matsuoka, H.; Tsubota, N. Lung Cancer in Women*. *Chest* **2000**, *118*, 1603-1609.
- (150) Visbal, A. L. Gender Differences in Non-Small-Cell Lung Cancer Survival: an Analysis of 4, 618 Patients Diagnosed Between 1997 and 2002. *Ann. Thorac. Surg.* **2004**, *78*, 209-215.
- (151) Stanley, K. E. Prognostic Factors for Survival in Patients With Inoperable Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1980**, *65*, 25-32.
- (152) Oken, M. M.; Creech, R. H.; Tormey, D. C.; Horton, J.; Davis, T. E.; McFadden, E. T.; Carbone, P. P. Toxicity and Response Criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J Clin Oncol* **1982**, *5*, 649-655.
- (153) Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Bougioukas, G.; Didilis, V.; Gatter, K. C.; Harris, A. L. Lactate Dehydrogenase-5 (LDH-5) Overexpression in Non-Small-Cell Lung Cancer Tissues Is Linked to Tumour Hypoxia, Angiogenic Factor Production and Poor Prognosis. *Br J Cancer* **0 AD**, *89*, 877-885.
- (154) Endoh, H.; Tomida, S.; Yatabe, Y.; Konishi, H.; Osada, H.; Tajima, K.; Kuwano, H.; Takahashi, T.; Mitsudomi, T. Prognostic Model of Pulmonary Adenocarcinoma by Expression Profiling of Eight Genes As Determined by Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 811-819.
- (155) Chen, H. Y.; Yu, S. L.; Chen, C. H.; Chang, G. C.; Chen, C. Y.; Yuan, A.; Cheng, C. L.; Wang, C. H.; Terng, H. J.; Kao, S. F.; Chan, W. K.; Li, H. N.; Liu, C. C.; Singh, S.; Chen, W. J.; Chen, J. J. W.; Yang, P. C. A Five-Gene Signature and Clinical Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 11-20.
- (156) Bepler, G.; Sharma, S.; Cantor, A.; Gautam, A.; Haura, E.; Simon, G.; Sharma, A.; Sommers, E.; Robinson, L. RRM1 and PTEN As Prognostic Parameters for Overall and

- Disease-Free Survival in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 1878-1885.
- (157) Zheng, Z.; Chen, T.; Li, X.; Haura, E.; Sharma, A.; Bepler, G. DNA Synthesis and Repair Genes RRM1 and ERCC1 in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 800-808.
- (158) Lacroix, M.; Toillon, R. A.; Leclercq, G. P53 and Breast Cancer, an Update. *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13*, 293-325.
- (159) Chang, F.; Syrjanen, S.; Syrjanen, K. Implications of the P53 Tumor-Suppressor Gene in Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* **1995**, *13*, 1009-1022.
- (160) Alarcon-Vargas, D.; Ronai, Z. P53 Mdm2 the Affair That Never Ends. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 541-547.
- (161) Joerger, A. C.; Fersht, A. R. The Tumor Suppressor P53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*.
- (162) Belyi, V. A.; Ak, P.; Markert, E.; Wang, H.; Hu, W.; Puzio-Kuter, A.; Levine, A. J. The Origins and Evolution of the P53 Family of Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*.
- (163) El-Deiry, W. S.; Kern, S. E.; Pietenpol, J. A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Definition of a Consensus Binding Site for P53. *Nat Genet* **1992**, *1*, 45-49.
- (164) Zilfou, J. T.; Lowe, S. W. Tumor Suppressive Functions of P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2009**, *1*.
- (165) Olivier, M.; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*.
- (166) Gonzalez, K. D.; Noltner, K. A.; Buzin, C. H.; Gu, D.; Wen-Fong, C. Y.; Nguyen, V. Q.; Han, J. H.; Lowstuter, K.; Longmate, J.; Sommer, S. S.; Weitzel, J. N. Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With P53 Germline Mutations. *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 1250-1256.
- (167) Cho, Y.; Gorina, S.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P. Crystal Structure of a P53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science* **1994**, *265*, 346-355.
- (168) Chiba, I.; Takahashi, T.; Nau, M. M.; D'Amico, D.; Curiel, D. T.; Mitsudomi, T.; Buchhagen, D. L.; Carbone, D.; Piantadosi, S.; Koga, H.; . Mutations in the P53 Gene Are Frequent in Primary, Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene* **1990**, *5*, 1603-1610.
- (169) Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. Mutations in the P53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research* **1994**, *54*, 4855-4878.
- (170) Quinlan, D. C.; Davidson, A. G.; Summers, C. L.; Warden, H. E.; Doshi, H. M. Accumulation of P53 Protein Correlates With a Poor Prognosis in Human Lung Cancer. *Cancer Research* **1992**, *52*, 4828-4831.

- (171) Horio, Y.; Takahashi, T.; Kuroishi, T.; Hibi, K.; Suyama, M.; Niimi, T.; Shimokata, K.; Yamakawa, K.; Nakamura, Y.; Ueda, R.; Takahashi, T. Prognostic Significance of P53 Mutations and 3p Deletions in Primary Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **1993**, *53*, 1-4.
- (172) Ebina, M.; Steinberg, S. M.; Mulshine, J. L.; Linnoila, R. I. Relationship of P53 Overexpression and Up-Regulation of Proliferating Cell Nuclear Antigen With the Clinical Course of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **1994**, *54*, 2496-2503.
- (173) Fukuyama, Y.; Mitsudomi, T.; Sugio, K.; Ishida, T.; Akazawa, K.; Sugimachi, K. K-Ras and P53 Mutations Are an Independent Unfavourable Prognostic Indicator in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Br J Cancer* **1997**, *75*, 1125-1130.
- (174) McLaren, R.; Kuzu, I.; Dunnill, M.; Harris, A.; Lane, D.; Gatter, K. C. The Relationship of P53 Immunostaining to Survival in Carcinoma of the Lung. *Br J Cancer* **1992**, *66*, 735-738.
- (175) Lee, J. S.; Yoon, A.; Kalapurakal, S. K.; Ro, J. Y.; Lee, J. J.; Tu, N.; Hittelman, W. N.; Hong, W. K. Expression of P53 Oncoprotein in Non-Small-Cell Lung Cancer: a Favorable Prognostic Factor. *Journal of Clinical Oncology* **1995**, *13*, 1893-1903.
- (176) Passlick, B.; Izbicki, J. R.; Hñussinger, K.; Thetter, O.; Pantel, K. Immunohistochemical detection of p53 protein is not associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **109**[6], 1205-1211. 1995.
- (177) Steels, E.; Paesmans, M.; Berghmans, T.; Branle, F.; Lemaitre, F.; Mascaux, C.; Meert, A. P.; Vallot, F.; Lafitte, J. J.; Sculier, J. P. Role of P53 As a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer: a Systematic Review of the Literature With a Meta-Analysis. *European Respiratory Journal* **2001**, *18*, 705-719.
- (178) Iorio, M. V.; Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 5848-5856.
- (179) He, L.; Hannon, G. J. MicroRNAs: Small RNAs With a Big Role in Gene Regulation. *Nat Rev Genet* **2004**, *5*, 522-531.
- (180) Rearick, D.; Prakash, A.; McSweeney, A.; Shepard, S. S.; Fedorova, L.; Fedorov, A. Critical Association of NcRNA With Introns. *Nucleic Acids Research* .
- (181) Taft, R. J.; Pang, K. C.; Mercer, T. R.; Dinger, M.; Mattick, J. S. Non-Coding RNAs: Regulators of Disease. *J. Pathol.* **2010**, *220*, 126-139.
- (182) Gaur, A.; Jewell, D. A.; Liang, Y.; Ridzon, D.; Moore, J. H.; Chen, C.; Ambros, V. R.; Israel, M. A. Characterization of MicroRNA Expression Levels and Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research* **2007**, *67*, 2456-2468.
- (183) Cowland, J. B.; Hother, C. H. R. I.; Gronbaek, K. I. R. S. MicroRNAs and Cancer. *APMIS* **2007**, *115*, 1090-1106.
- (184) Rana, T. M. Illuminating the Silence: Understanding the Structure and Function of Small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 23-36.

- (185) Chu, C. y.; Rana, T. M. Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/P54. *PLoS Biol* **2006**, *4*, e210.
- (186) Calin, G. A.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Negrini, M.; Bullrich, F.; Croce, C. M. Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro- RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2002**, *99*, 15524-15529.
- (187) Cimmino, A.; Calin, G. A.; Fabbri, M.; Iorio, M. V.; Ferracin, M.; Shimizu, M.; Wojcik, S. E.; Aqeilan, R. I.; Zupo, S.; Dono, M.; Rassenti, L.; Alder, H.; Volinia, S.; Liu, C. g.; Kipps, T. J.; Negrini, M.; Croce, C. M. MiR-15 and MiR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2005**, *102*, 13944-13949.
- (188) Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. Oncomirs [Mdash] MicroRNAs With a Role in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 259-269.
- (189) Yanaihara, N.; Caplen, N.; Bowman, E.; Seike, M.; Kumamoto, K.; Yi, M.; Stephens, R. M.; Okamoto, A.; Yokota, J.; Tanaka, T.; Calin, G. A.; Liu, C. g.; Croce, C. M.; Harris, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell* *9*[3], 189-198. 2006.
- (190) Hu, Z.; Chen, X.; Zhao, Y.; Tian, T.; Jin, G.; Shu, Y.; Chen, Y.; Xu, L.; Zen, K.; Zhang, C.; Shen, H. Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-ÇSmall-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 1721-1726.
- (191) Takamizawa, J.; Konishi, H.; Yanagisawa, K.; Tomida, S.; Osada, H.; Endoh, H.; Harano, T.; Yatabe, Y.; Nagino, M.; Nimura, Y.; Mitsudomi, T.; Takahashi, T. Reduced Expression of the Let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association With Shortened Postoperative Survival. *Cancer Research* **2004**, *64*, 3753-3756.
- (192) Johnson, S. M.; Grosshans, H.; Shingara, J.; Byrom, M.; Jarvis, R.; Cheng, A.; Labourier, E.; Reinert, K. L.; Brown, D.; Slack, F. J. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* *120*[5], 635-647. 2005.
- (193) Patnaik, S. K.; Kannisto, E.; Knudsen, S.; Yendamuri, S. Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-ÇSmall Cell Lung Cancer After Surgical Resection. *Cancer Research* **2010**, *70*, 36-45.
- (194) Bandi, N.; Zbinden, S.; Gugger, M.; Arnold, M.; Kocher, V.; Hasan, L.; Kappeler, A.; Brunner, T.; Vassella, E. MiR-15a and MiR-16 Are Implicated in Cell Cycle Regulation in a Rb-Dependent Manner and Are Frequently Deleted or Down-Regulated in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **2009**, *69*, 5553-5559.
- (195) Karube, Y.; Tanaka, H.; Osada, H.; Tomida, S.; Tatematsu, Y.; Yanagisawa, K.; Yatabe, Y.; Takamizawa, J.; Miyoshi, S.; Mitsudomi, T.; Takahashi, T. Reduced Expression of Dicer Associated With Poor Prognosis in Lung Cancer Patients. *Cancer Science* **2005**, *96*, 111-115.

- (196) Bommer, G. T.; Gerin, I.; Feng, Y.; Kaczorowski, A. J.; Kuick, R.; Love, R. E.; Zhai, Y.; Giordano, T. J.; Qin, Z. S.; Moore, B. B.; MacDougald, O. A.; Cho, K. R.; Fearon, E. R. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current biology : CB* **17**[15], 1298-1307. 2007.
- (197) Hermeking, H. The MiR-34 Family in Cancer and Apoptosis. *Cell Death Differ* **2009**, *17*, 193-199.
- (198) Welch, C.; Chen, Y.; Stallings, R. L. MicroRNA-34a Functions As a Potential Tumor Suppressor by Inducing Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 5017-5022.
- (199) Ji, Q.; Hao, X.; Zhang, M.; Tang, W.; Yang, M.; Li, L.; Xiang, D.; DeSano, J. T.; Bommer, G. T.; Fan, D.; Fearon, E. R.; Lawrence, T. S.; Xu, L. MicroRNA MiR-34 Inhibits Human Pancreatic Cancer Tumor-Initiating Cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6816.
- (200) Tarasov, V.; Jung, P.; Verdoodt, B.; Lodygin, D.; Epanchintsev, A.; Menssen, A.; Meister, G.; Hermeking, H.; Kim, V. N. Differential Regulation of MicroRNAs by P53 Revealed by Massively Parallel Sequencing: MiR-34a Is a P53 Target That Induces Apoptosis and G1-Arrest Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1586-1593.
- (201) Lodygin, D.; Tarasov, V.; Epanchintsev, A.; Berking, C.; Knyazeva, T.; Korner, H.; Knyazev, P.; Diebold, J.; Hermeking, H.; Boominathan, L. Inactivation of MiR-34a by Aberrant CpG Methylation in Multiple Types of Cancer. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2591-2600.
- (202) Yamakuchi, M.; Ferlito, M.; Lowenstein, C. J. MiR-34a Repression of SIRT1 Regulates Apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 13421-13426.
- (203) He, X.; He, L.; Hannon, G. J. The Guardian's Little Helper: MicroRNAs in the P53 Tumor Suppressor Network. *Cancer Research* **2007**, *67*, 11099-11101.
- (204) Hermeking, H. p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer cell* **12**[5], 414-418. 2007.
- (205) Suzuki, H. I.; Yamagata, K.; Sugimoto, K.; Iwamoto, T.; Kato, S.; Miyazono, K. Modulation of MicroRNA Processing by P53. *Nature* **2009**, *460*, 529-533.
- (206) Feng, Z.; Zhang, C.; Wu, R.; Hu, W. Tumor Suppressor P53 Meets MicroRNAs. *Journal of Molecular Cell Biology* **2011**, *3*, 44-50.
- (207) Zhang, X.; Wan, G.; Mlotshwa, S.; Vance, V.; Berger, F. G.; Chen, H.; Lu, X. Oncogenic Wip1 Phosphatase Is Inhibited by MiR-16 in the DNA Damage Signaling Pathway. *Cancer Research* **2010**, *70*, 7176-7186.
- (208) Zhang, X.; Chen, J.; Radcliffe, T.; LeBrun, D. P.; Tron, V. A.; Feilotter, H. An Array-Based Analysis of MicroRNA Expression Comparing Matched Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Human Tissue Samples. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **10**[6], 513-519. 2008.

- (209) Xi, Y.; Nakajima, G.; Gavin, E.; Morris, C. G.; Kudo, K.; Hayashi, K.; Ju, J. Systematic Analysis of MicroRNA Expression of RNA Extracted From Fresh Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples. *RNA* **2007**, *13*, 1668-1674.
- (210) Linsley, P. S.; Schelter, J.; Burchard, J.; Kibukawa, M.; Martin, M. M.; Bartz, S. R.; Johnson, J. M.; Cummins, J. M.; Raymond, C. K.; Dai, H.; Chau, N.; Cleary, M.; Jackson, A. L.; Carleton, M.; Lim, L. Transcripts Targeted by the MicroRNA-16 Family Cooperatively Regulate Cell Cycle Progression. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 2240-2252.

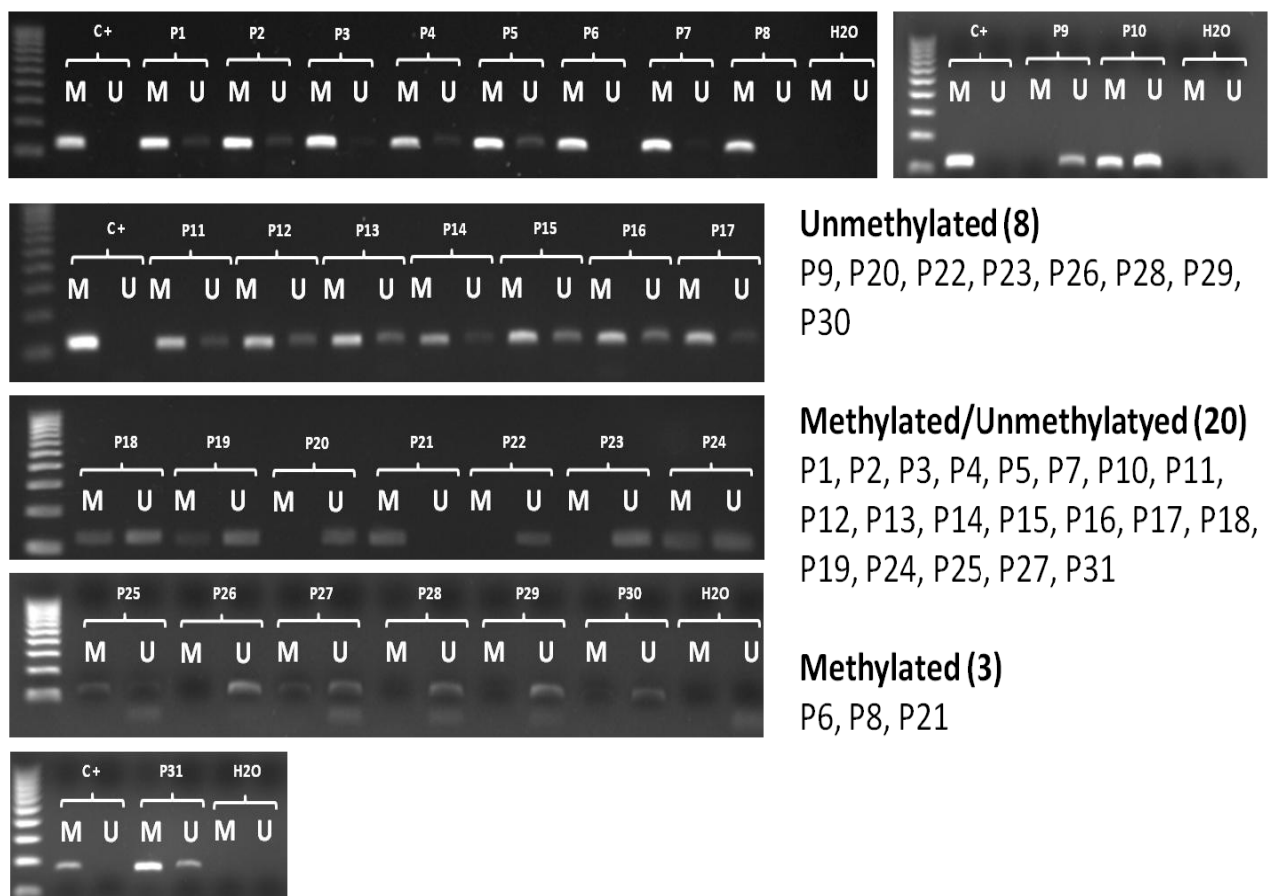
ANEXOS

MATERIAL SUPLEMENTARIO TRABAJO 1

Figura suplementaria 1

Resultados del análisis MSP de los 31 pacientes. Ocho pacientes estaban no metilados; Veinte estaban metilados/no metilados; Tres estaban metilados.

Supplementary Figure 1



MATERIAL SUPLEMENTARIO TRABAJO 2

Figura suplementaria 1

Expresión normalizada de miR-143 en el tumor y en el tejido normal pareado de los pacientes con CPNCP.

Supplementary Figure 1

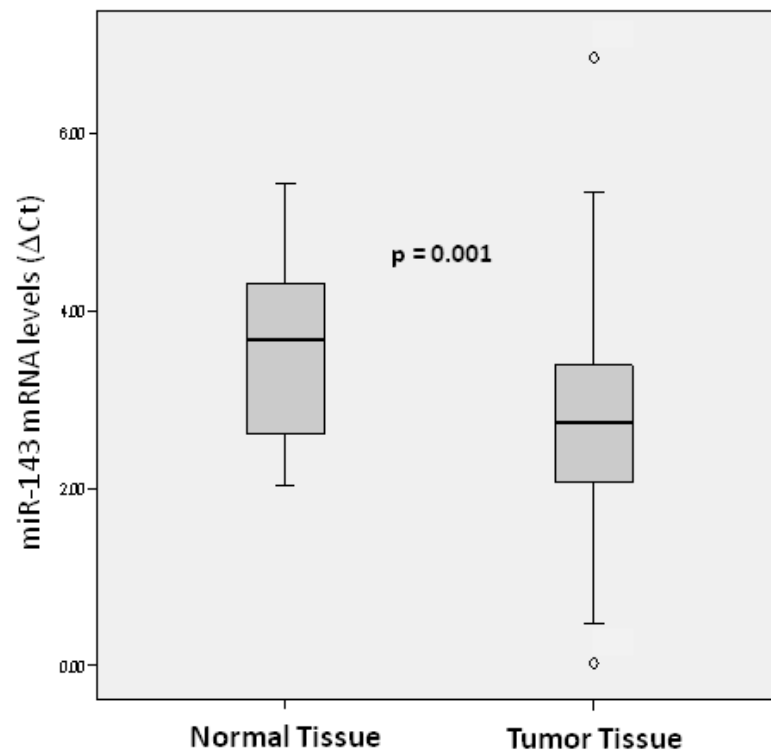


Figura suplementaria 2

Niveles de expresión de miR-16 y miR-143 de acuerdo al estado mutacional de p53.

Supplementary Figure 2

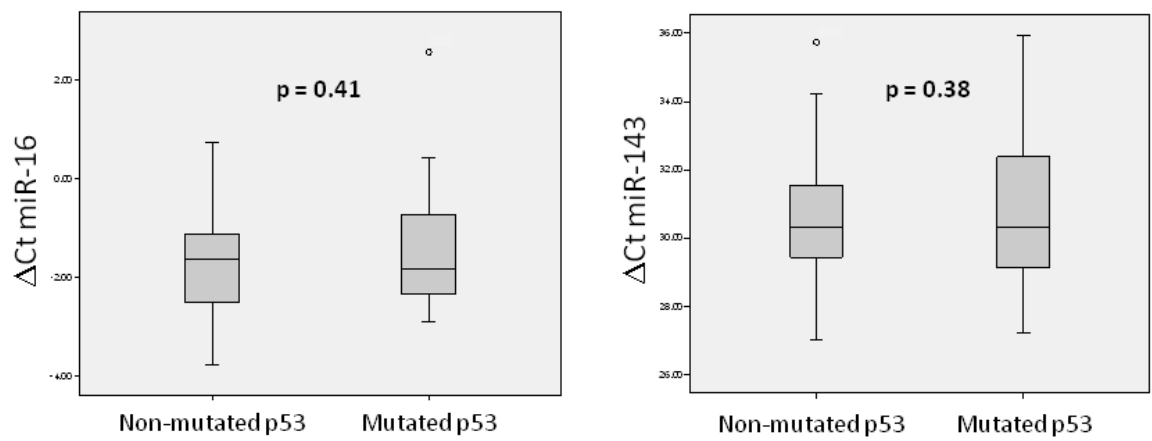
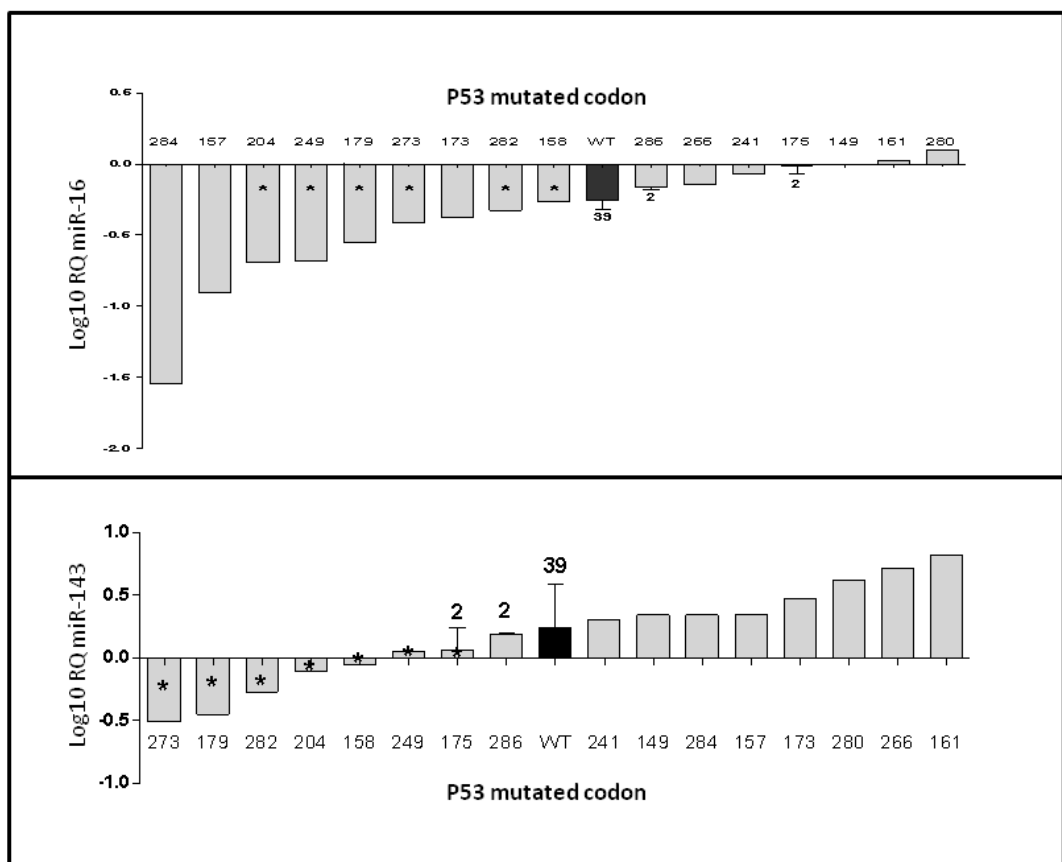


Figura suplementaria 3

Niveles de expresión de miR-16 y miR-143 de acuerdo al tipo de mutación de p53. Treinta nueve pacientes tenía p53 nativo; dos pacientes tenían mutaciones en el codón 286 y dos pacientes tenían mutaciones en el codón 175. Otras mutaciones se encontraron en un solo paciente.

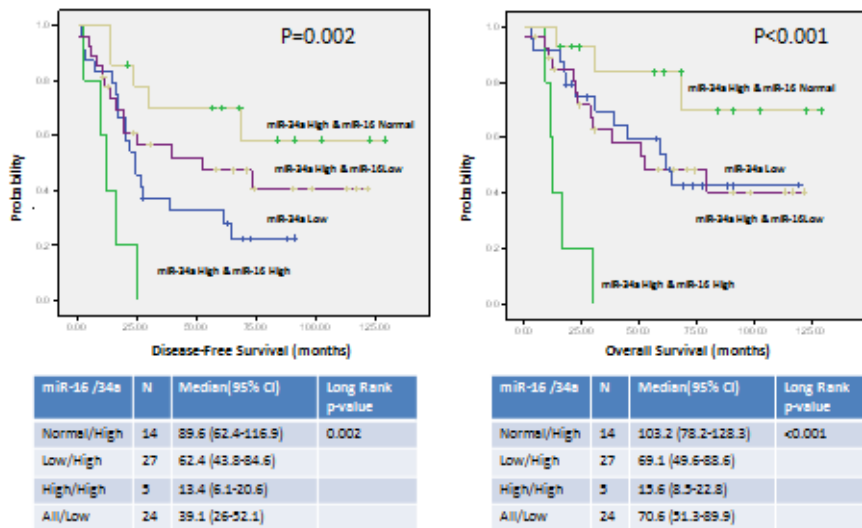
* indica mutaciones que muestran bajos niveles de miR-16 y miR-143.

Supplementary Figure 3



ANEXO III

MATERIAL SUPLEMENTARIO AL TRABAJO II



Curvas de Kaplan-Meier para SLE y SG en 70 pacientes con CPNCP agrupados de acuerdo a los niveles de expresión alto, normal o bajo de miR-16 y alto o bajo de miR-34a. Los p-valores corresponden a los log Rank test y se consideraron significativos si $P \leq 0.05$. Entre los 46 pacientes con niveles altos de miR-34a, se objetivaron diferencias significativas en SLE y SG, de acuerdo a los niveles de miR-16 en SLE y DFS, mientras que todos los pacientes con niveles bajos de miR-34a tuvieron un pronóstico muy malo, independientemente de los niveles de miR-16.