



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA - IBUN

Nuevos biomarcadores moleculares para la detección del cáncer de pulmón: una aproximación desde la oncogenómica funcional

Autores:

Sandra Janneth Perdomo Lara

Matias Daniel Butti

Martin Carlos Abba

Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez

Nuevos biomarcadores moleculares para la detección del cáncer de pulmón: una aproximación desde la oncogenómica funcional.

© Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Instituto de Biotecnología.

© Sandra Janneth Perdomo Lara, Matias Daniel Butti, Martín Carlos Abba, Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez, autores.

Editorial
Universidad Nacional de Colombia
958-761

Primera edición, 2013

ISBN Obra Independiente:
978-958-761-659-0

Diseño y diagramación: Unidad de Medios de Comunicación - Unimedios, Comunicación Estratégica.

Corrección de estilo: Verónica Barreto.

Bogotá, D. C., Colombia 2013

Hecho en Colombia

Contenido

Resumen/4

Búsqueda de marcadores moleculares para la detección de cáncer de pulmón: análisis bioinformático de 40 perfiles de expresión génica/5

Marco conceptual/6

La bioinformática y el descubrimiento de biomarcadores de cáncer/6

SIGNATURE: análisis de la expresión génica/7

Materiales y métodos/10

Identificación de características comunes de expresión en las “firmas moleculares” de cáncer de pulmón/10

Extracción de los datos y agrupación jerárquica/11

Análisis de minería de datos/11

Expresión génica metasignatura y análisis de supervivencia/12

Resultados y discusión/12

Identificación del metasignatura de expresión génica y análisis de minería de datos/13

Vías de señalización biológicas enriquecidas (Kegg)/15

Módulos de expresión génica asociados con el metasignatura/17

Regulación de la transición G1/S del ciclo celular “E2F3”/17

Regulación del punto de control del huso mitótico MAD2L1, BUB1B y CENP-A/18-20

Proteínas del complejo Polycomb y cáncer de pulmón/20

Significado clínico de ciclina B1 (CCNB1), ciclina B2 (CCNB2), ciclina A2 (CCNA2) y WEE en cáncer de pulmón/21

Relevancia pronóstica de la expresión de PCNA en cáncer de pulmón/22

Topoisomerasa II (TOPA2) y resistencia en cáncer de pulmón/23

Familia de proteínas Ras GTPasas/24

Influencia del gen transformante de tumores de pituitaria PPTG1 en cáncer de pulmón/25

Familia de genes MYC y cáncer de pulmón/26

Fosfoglicerato quinasa (PGK1) y cáncer de pulmón/27

Genes de reparación (MSH6, PCNA y RFC4)/28

Reparación del ADN y CP/28

Módulo de proteínas de matriz extracelular y metabolismo celular/29

Relevancia de las citoqueratinas y TTF-1 (NKX2-1) en cáncer de pulmón/29

Colágeno en CP/30

Proteína surfactante C (PS-C) para la detección de CP en sangre periférica/31

Cáncer de pulmón invasivo y expresión de la molécula de adhesión 1 (ICAM-1)/31

Expresión diferencial de la enzima superóxido dismutasa (SOD2) en cáncer de pulmón/32

Aldehído deshidrogenasa (ALDH1A1) y CP/33

Ontología/34

Ontología GO: procesos biológicos/34

Ontología GO: componente celular/35

Ontología GO: función molecular/36

Conclusiones/37

Referencias bibliográficas/40

Anexos/48

Vías de señalización biológicas enriquecidas en el metasignatura/48

Resumen

En las últimas dos décadas, el avance en el conocimiento de la biología del cáncer ha llevado a la identificación de circuitos moleculares diferenciales en tumores sólidos. Estos reflejan alteraciones en vías de señalización específicas que podrían estar involucradas en la progresión maligna. El conocimiento de estas alteraciones ha generado un gran panel de posibles biomarcadores que requieren ser probados y validados para ser utilizados en el entorno clínico.

En este capítulo se describe un abordaje bioinformático de análisis transcriptómico “metasignature” obtenido a partir de 40 estudios de expresión génica en muestras clínicas de cáncer de pulmón (CP) disponibles en las bases de datos en línea GeneSigDB y MolSigDB, en un esfuerzo por identificar genes como potenciales biomarcadores.

Los datos generados evidenciaron un grupo de 34 genes que podrían ser utilizados para discriminar entre fenotipo tumoral y normal ($p < 0.01$), según el grupo de datos “dataset” de Bittner, y para diferenciar entre los tipos histopatológicos de CP, según el grupo de datos de Takeuchi y col., 2006⁽¹⁾. Además, el metasignature es capaz de discriminar los adenocarcinomas pulmonares de buen y mal pronóstico ($p = 0,028$) y un subconjunto de 13 genes del metasignature asociados con buen pronóstico de sobrevida ($p = 0,0037$). Se identificaron tres módulos funcionales significativamente afectados en el metasignature, relacionados con alteraciones en el ciclo celular, remodelación de la matriz extracelular, procesos metabólicos, transducción de señales y reparación del ADN.



Foto archivo Unimedios

Búsqueda de marcadores moleculares para la detección de cáncer de pulmón: análisis bioinformático de 40 perfiles de expresión génica

El cáncer es una de las patologías con las mayores tasas de mortalidad en el mundo, con una incidencia aún creciente (Parkin y col., 2005; Kanavos y col., 2006). Se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conllevan a la desregulación del ciclo celular y por ende al crecimiento descontrolado de células. Dentro de los tipos de cáncer, el de pulmón presenta una de las tasas más altas de mortalidad (entre 80% y 85%) y una sobrevida del 15% a los 5 años ^(1,2).

Los tratamientos actuales ofrecen la posibilidad de mejoría solo para los pacientes en las primeras etapas de la carcinogénesis pulmonar, mientras que los resultados para aquellos con enfermedad avanzada siguen siendo limitados. Los avances recientes en las estrategias terapéuticas, incluyendo la quimioterapia adyuvante y las terapias biológicas dirigidas, han dado lugar a progresos modestos en la supervivencia de pequeños subgrupos de pacientes. Son necesarios nuevos enfoques de tratamiento para ampliar sustancialmente los resultados.

Como ha sucedido para otros tipos tumorales, el análisis de los perfiles moleculares ha permitido comprender mejor la patogénesis de la enfermedad e identificar subgrupos de pacientes en los que las terapias actuales tienen más probabilidades de ser eficaces para el desarrollo de nuevos tratamientos.

A través del análisis de los perfiles de expresión génica ^(3, 4) se han rastreado muchos biomarcadores de cáncer que han aportado información acerca del diagnóstico, monitoreo, seguimiento y pronóstico de los pacientes. Además, han contribuido a reducir la mortalidad ^(2, 5).

Por esto, la importancia de los estudios de perfiles moleculares es identificar los genes cuya expresión se altera por cambios heredables en la función del gen y aquellos en que los cambios son una consecuencia inevitable de la patogénesis de la enfermedad. La correlación de los resultados derivados de la transcriptómica y de la genómica permitirá análisis más específicos de la gran cantidad de alteraciones genéticas identificadas en los perfiles moleculares.

En CP, el estudio de los perfiles moleculares muestra patrones de expresión génica que se asocian con fenotipos específicos y con el pronóstico de los pacientes. Estas correlaciones pueden precisar, en las primeras etapas, los pacientes que están en mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, predecir el pronóstico después de la resección quirúrgica completa y determinar quiénes podrían beneficiarse de la terapia adyuvante. Además, contribuyen a identificar vías moleculares aberrantes que podrían ser útiles como blancos terapéuticos en pacientes con enfermedad en estadio temprano, y por consiguiente mejorar las estrategias de tratamiento ^(6, 7, 8).

En el presente libro se describe una integración global de 40 perfiles de expresión en CP, en un esfuerzo por identificar los biomarcadores más relevantes que podrían ser aplicados en la detección, diagnóstico temprano y pronóstico de los pacientes con esta patología.

Marco conceptual

La bioinformática y el descubrimiento de biomarcadores de cáncer

Los perfiles de expresión génica utilizando microarreglos (ADN y ARN) surgieron como una tecnología eficaz para evaluar tanto el genoma como el transcriptoma de las células tumorales. Varios estudios han presentado el análisis de muestras clínicas identificando perfiles de expresión génica para los tipos y subtipos de cáncer y han descrito patrones de expresión que se correlacionan con el grado del tumor, estado de diferenciación, potencial metastásico y sobrevida de los pacientes. La utilización de esta tecnología ha generado una cantidad considerable de información relacionada con la identificación de grupos de genes involucrados en la modulación de vías de señalización diferencialmente afectadas en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos sanos.

La convergencia de estas tecnologías genómicas permitió el diseño y desarrollo de fármacos contra dianas moleculares específicas, mediante la integración de las herramientas moleculares y los grandes conjuntos de datos generados. Con ello se han logrado rastrear genes que representan los diferentes estados biológicos presentes en la patología, los cuales podrían ser aplicados como potenciales blancos moleculares para su posterior validación experimental.

En este sentido, los biomarcadores son indicadores medibles de procesos biológicos normales, de procesos patogénicos o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Están destinados a sustituir un criterio de valoración clínica, basados en evidencias epidemiológicas, pruebas terapéuticas, científicas y fisiopatológicas ⁽⁹⁾. Desde la perspectiva clínica, los biomarcadores tienen un alto impacto sobre el cuidado de los pacientes que sospechen tener alguna enfermedad o presenten susceptibilidad genética de desarrollarla. De acuerdo con esta categorización, los biomarcadores se clasifican así: de diagnóstico, pronóstico, potenciales blancos de manejo y tratamiento y marcadores de detección. Estos últimos son de gran interés debido a su capacidad para predecir eventos futuros, pero en la actualidad son pocos los biomarcadores aceptados para la detección de enfermedades ^(10, 11, 13).

Los biomarcadores moleculares incluyen genes alterados o mutados, ARN, proteínas, lípidos, carbohidratos y pequeños metabolitos que pueden estar correlacionados con un comportamiento biológico o un desenlace clínico. La mayoría de biomarcadores de cáncer que actualmente se conocen fueron descubiertos por estudios de perfiles moleculares en muestras clínicas y en líneas celulares tumorales, basados en asociaciones o correlaciones entre los perfiles encontrados y el comportamiento de la enfermedad. Uno de los primeros perfiles moleculares descritos fue el reportado por Golub et al., quien mostró que los patrones de expresión podrían clasificar los tumores dando información acerca del estado, grado de diferenciación, curso clínico y respuesta al tratamiento ⁽¹³⁾.

En general, la búsqueda, verificación, interpretación biológica, bioquímica, fisiológica y la validación de marcadores de enfermedad requiere de la innovación en las tecnologías de alto rendimiento, la bioestadística y la bioinformática, además del trabajo interdisciplinario de los clínicos, biólogos, bioquímicos y bioinformáticos para llevar a cabo todos los pasos de estudio de cohorte de los biomarcadores, su implementación y control ⁽¹⁴⁾.

SIGNATURE: análisis de la expresión génica

Las firmas de expresión génica “signatures” son herramientas poderosas que pueden revelar las características biológicas y de importancia clínica en las muestras. En los últimos años, las firmas moleculares se han desarrollado para diferenciar subtipos de cáncer, detallar respuestas celulares al entorno (hipoxia), predecir resultados clínicos y como modelo de activación de vías de señalización ⁽¹⁵⁾. El poder de los signature se deriva de su capacidad para conectar un estado experimental *in vitro* con uno *in vivo*, de una manera cuantitativa. Por lo general, el término firma de expresión génica “signature” se ha utilizado de dos maneras. En la primera, la firma se compone de un conjunto de genes que comparten un patrón común de expresión, o genes que aumentan o disminuyen la expresión, pero la característica básica de la firma es la identidad de los genes. Por eso, estas firmas son llamadas conjuntos de genes, que se han curado de la literatura y se recogen en bases de datos como MSigDB y GeneSigDB ^(16, 17).

El segundo tipo de signature se refiere a la magnitud del aumento o disminución en la expresión génica, en la forma de valores ponderados, con un fenotipo biológico mediante un modelo cuantitativo de predicción^(18,19). Estas firmas suelen desarrollarse a partir de las condiciones experimentales que controlan con precisión el fenotipo de interés; por ejemplo, la activación de una vía de señalización celular o la respuesta de las células a un estímulo definido.

En resumen, el análisis de las firmas de expresión génica requiere de una confluencia de conocimientos a través de una amplia gama de disciplinas, incluyendo la estadística, la biología y ciencias de la computación.

A continuación se describen los enfoques computacionales más comunes que tienen aplicación en el descubrimiento de nuevos blancos moleculares. A este respecto, los análisis de los datos generados de microarreglos generalmente se dividen en dos categorías: análisis supervisado y análisis no supervisado. El análisis supervisado utiliza identidades conocidas de muestras para generar predictores que clasifican muestras desconocidas con propósitos diagnósticos. Se emplea básicamente para encontrar una firma molecular o un conjunto reducido de genes cuyo perfil de expresión permita clasificar una muestra; es decir, partimos de un patrón de expresión génica determinado. Una aplicación típica es catalogar una muestra de un paciente con un síntoma determinado en alguno de los grupos ya establecidos^(20, 21, 22, 13).

El análisis no supervisado implica el uso de una distancia métrica para grupos de muestras o genes^(23, 24, 25) y tiene aplicaciones directas en el descubrimiento de blancos moleculares. El objetivo principal es delimitar los elementos que presentan un patrón similar, ya sean genes o muestras. La aplicación de los métodos no supervisados es descubrir los patrones de expresión que posteriormente podrán usarse en análisis supervisados, en detectar genes co-regulados.

Para construir los grupos de genes o muestras con perfiles de expresión similares se debe utilizar una medida de distancia. Las más usadas son la euclidiana y la correlación de Pearson y de Spearman. En el caso de los métodos de agrupamiento jerárquicos hay que definir, además, el método para determinar distancias entre conjuntos de genes.

Los métodos de agrupamiento por lo general no necesitan de una información de partida sobre los clúster, sino que los algoritmos agrupan las muestras basándose en el grado de similitud entre los perfiles de expresión de los genes en estudio. El método de agrupamiento más empleado en datos de microarreglos es el agrupamiento jerárquico. Este método no supervisado deriva una serie de particiones de los datos. En este caso, cada dato será el perfil de expresión de una muestra o gen. Asimismo, existen varios tipos de métodos de agrupamiento jerárquico, tales como el aglomerativo y el divisivo; los divisivos funcionan mejor para dividir los datos en pocos grupos de varios elementos. El resultado de estos métodos es una estructura de árbol o dendograma⁽²⁶⁾.

De esta manera, los genes candidatos para ser evaluados como potenciales marcadores pueden definirse por agrupamientos "clúster" que tienen características deseables de expresión, por ejemplo expresión alta en los tumores con respecto a los tejidos normales. Sin embargo, debido a que el cáncer es una enfermedad heterogénea, es común incluir tantas muestras como sea posible en un análisis determinado para realizar el análisis estadístico (ANOVA o la prueba t)^(20, 27), además de utilizar el análisis basado

en gen por gen para establecer rangos de genes y asignar significancias estadísticas a los resultados.

La variabilidad biológica de los resultados se reduce con la precisión de las técnicas de muestreo, como la microdissección láser, que puede disminuir la contribución de tipos celulares no relevantes para los perfiles de expresión. No obstante, los tumores con características histopatológicas similares e incluso el mismo diagnóstico pueden representar más de una única enfermedad a nivel molecular. Staudt y colaboradores utilizaron la agrupación jerárquica para subclasificar el linfoma difuso de células grandes b en tres subtipos, cada uno caracterizado por grupos de perfiles de expresión de genes específicos ⁽²⁸⁾.

Además, es probable que los genes que presenten patrones de expresión similares tengan funciones relacionadas. Por lo tanto, la búsqueda de estos genes similares a aquellos ya conocidos como marcadores tumorales resulta un método efectivo para la búsqueda de nuevos candidatos de marcadores ⁽²⁹⁾. Esta aproximación se puede llevar a cabo mediante la comparación de los patrones de expresión génica con un conjunto de datos “dataset” para los marcadores conocidos, usando una distancia métrica apropiada (por ejemplo, coeficiente de correlación de Pearson) y eligiendo el rango más alto de coincidencias. La acumulación de los datos generados de microarreglos para el descubrimiento de blancos de cáncer es igualmente importante en estas metodologías.

Numerosos estudios de expresión génica en varios tipos de cáncer se asocian a conjuntos de datos que pueden ser descargados, en su mayoría, en repositorios públicos dedicados específicamente a su difusión (**Tabla 1**). Estos incluyen sitios web como la base de datos de microarreglos de Stanford (<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD>), NCBI “GEO” (Gene Expression Omnibus) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), el repositorio de EBI ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) o el programa de genómica del cáncer “MIT Cancer Genomics Program” (<http://www.broad.mit.edu/cancer/>). Estos son recursos informáticos valiosos para el descubrimiento de biomarcadores. Por ejemplo, la colección de datos del mapa global de cáncer “Global Cancer Map” ⁽³¹⁾, que contiene datos de 216 muestras tumorales de 14 tipos de cáncer, junto con 90 tejidos normales, se puede utilizar para encontrar genes altamente expresados en CP, pero con baja expresión en tejidos normales. Todavía hay grandes desafíos en la integración de los datos de los microarreglos de diferentes fuentes, y la representación de datos puede ser heterogénea e inconsistente, pero la estandarización ⁽³¹⁾ e integración ⁽³²⁾ de los datos generados debe surgir en los próximos años para permitir la representación uniforme de las matrices de datos para el descubrimiento efectivo de blancos moleculares.

Finalmente, los blancos atractivos no solo se definen por sus patrones de expresión. Otros criterios que incluyen el tipo de molécula (p.e. Quinasa), localización subcelular (p.e. membrana celular), vía biológica (angiogénesis) son importantes en la decisión y seguimiento de nuevos biomarcadores moleculares. Para este fin, los recursos bioinformáticos como “Gene Ontology Project” (<http://www.geneontology.org>) y la “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways Project” (<http://www.genome.ad.jp/keggon>) intentan poner los genes en el contexto de su función biológica, localización y vía de señalización ⁽³³⁾.

Nombre	Descripción	URL
Cancer Genes	Colección de genes de cáncer basados sobre datos de mutaciones	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGPI/Census/
Stanford Microarray Database (SMD)	Repositorio de datos de microarreglos con herramientas de análisis	http://genome-www5.stanford.edu
Whitehead Institute Center for Genome Research, cancer Genomics Project	Repositorio de datos de microarreglos de publicaciones de genómica del cáncer	http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/cancer/datasets.cgi
Gene Expression Omnibus (GEO)	Repositorio de datos de microarreglos, de una variedad de fuentes incluyendo CGH	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Gene Ontology Project (GO)	Vocabulario controlado que describe la función molecular, procesos biológicos y componentes celulares	http://www.geneontology.org/
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways (KEGG Pathways)	Redes de interacción molecular, incluyendo vías metabólicas y regulatorias y complejos moleculares	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sage
SAGE Genie	Métodos Analíticos de tag	http://www.cgap.ncl.nih.gov/SAGE
DGEN	Expresión digital de genes digital genes herramienta de visualización cuantitativa que compara dos grupos de bibliotecas EST	http://cgap.nci.gov/Tissues/GXS
cDNAxProfiler	Compara la expresión de genes de dos grupos de librerías de EST	http://cgap.nci.gov/Tissues/ixProfiler
GEPIs	EST basado en los datos de expresión génica de perfiles y análisis	http://cgl.ucsf.edu/Research/gene_ntech/gepis/
Progenetix	Repositorio de anomalías citogenéticas en cáncer humano	http://www.progenetix.com/
SKY/M-FISH and CGH Database	Repositorio de anomalías citogenéticas en cáncer humano	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/
SNP500Cancer	SNPs validados en genes de cáncer	http://snp500cancer.nci.nih.gov/home.cfm

Tabla 1. Recursos en línea para la búsqueda y análisis de blancos de cáncer

Materiales y métodos

Identificación de características comunes de expresión en las “firmas moleculares” de cáncer de pulmón

Para determinar los genes comunes que se superponen en las “firmas moleculares” de expresión en CP, se emplearon las bases de datos en línea GeneSigDB 2.0 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/genesigdb>) y MolSigDB 3.0 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>). Estas son bases de datos de expresión génica curadas y estandarizadas manualmente, las cuales contienen información de estudios de cáncer y de células madre. De allí se seleccionaron 40 estudios de perfiles de expresión en CP (de 2002 a 2008) y se identificaron los genes más relevantes. Posteriormente, se elaboró

un mapa de calor con la aplicación GeneSigDB en color rojo o gris, según la presencia o ausencia de solapamiento de genes, respectivamente.

Extracción de los datos y agrupación jerárquica

La gestión de los datos de GeneSigDB y MolSigDB se realizó usando una herramienta Java personalizada HEM2TEM para la extracción de una matriz de texto sin formato desde el mapa de calor a XML/HTML. Para permitir la clasificación no supervisada y la ilustración de los genes comúnmente superpuestos entre las 40 “firmas moleculares” de CP, se utilizó el programa MultiExperiment Viewer (MeV 4.5) (<http://www.tm4.org/mev/>). Las agrupaciones jerárquicas se utilizaron para determinar la relación entre los 40 “signatures” de expresión génica. Los clúster jerárquicos se basaron en el índice de correlación de Spearman y el método de agrupación completa.

Además, se evaluó si los términos semánticos (nombre de las firmas moleculares, nombre de la plataforma o proceso biológico) difieren a lo largo del agrupamiento, usando el test exacto de Fisher. Para esto, todos los valores p fueron de dos colas, y un $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

Luego se seleccionaron los genes que se superponen con mayor frecuencia, aplicando un cutoff de 5 genes de las firmas moleculares para generar el “metasignature” de expresión para su análisis posterior.

Análisis de minería de datos

Para realizar la anotación funcional automatizada y la clasificación de los genes que se encontraron interesantes en el metasignature con base en Gene Ontology (GO), se utilizó la base de datos para anotación y visualización integrada DAVID 5 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

Con el fin de identificar las vías moleculares que se vieron afectadas por el metasignature, se analizaron las redes de interacción proteína/gen en el núcleo común de genes superpuestos. La red de interacción proteína-proteína se generó utilizando la base de datos String (<http://string.embl.de/>). Esta herramienta informática permitió coleccionar, predecir y unificar la mayoría de los tipos de asociaciones proteína-proteína, incluidas las asociaciones directas e indirectas. String ejecuta un conjunto de algoritmos de predicción y transfiere las interacciones conocidas desde organismos modelo a otras especies, basado en la ortología de predicción de las proteínas respectivas. Con el fin de identificar cada gen en la base de datos, se utilizaron tanto los nombres de los genes como los identificadores de Esembl en la aplicación modo proteína. Las opciones de entrada para el análisis fueron co-ocurrencia, co-expresión, experimentos, bases de datos y minería de texto, datos a alto nivel de confianza para predecir grupos de ortología humana.

Expresión génica metasignature y análisis de supervivencia

Para evaluar el valor pronóstico del metasignature de expresión génica, se realizó un análisis de supervivencia. Los experimentos empleados para la validación y comparación fueron extraídos de los siguientes estudios:

- Takeuchi y col., 2006 (Agilent) ⁽³⁴⁾
- Bittner y col., 2000 ⁽³⁵⁾

Resultados y discusión

Con el objetivo de identificar biomarcadores moleculares relevantes que puedan ser aplicados a diagnóstico, monitoreo y seguimiento, pronóstico y respuesta a tratamiento en CP, se realizó un análisis bioinformático de 40 “firmas moleculares” encontradas en las bases de datos GeneSigDB 2.0 y MolSigDB 3.0 para generar finalmente un “metasignature” de 34 genes involucrados en el proceso tumoral. Para esto se cumplieron cuatro fases de análisis que se observan en la **Figura 1**: a) identificación de genes superpuestos o genes comunes entre las diferentes firmas moleculares de expresión; b) evaluación de la relación entre las firmas moleculares de expresión génica por análisis no supervisado de dos vías; c) identificación de las vías moleculares que se afectaron en el metasignature, seguida por d) la validación de la expresión génica y evaluación del valor pronóstico del metasignature en una serie de 163 muestras primarias de CP en el conjunto de datos de Takehuchi y 117 muestras del conjunto de datos de Bittner

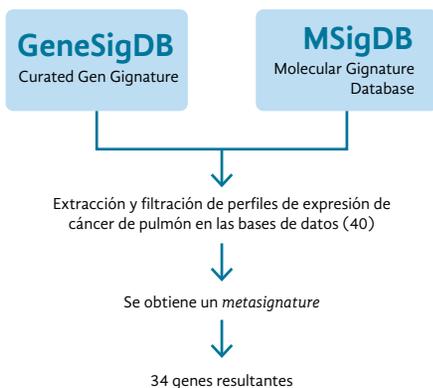


Diagrama de flujo del análisis bioinformático. Comprende la extracción de la información de perfiles de expresión desde las bases de datos GeneSingDB y MSigDB, generación del metasignature y evaluación del poder pronóstico.

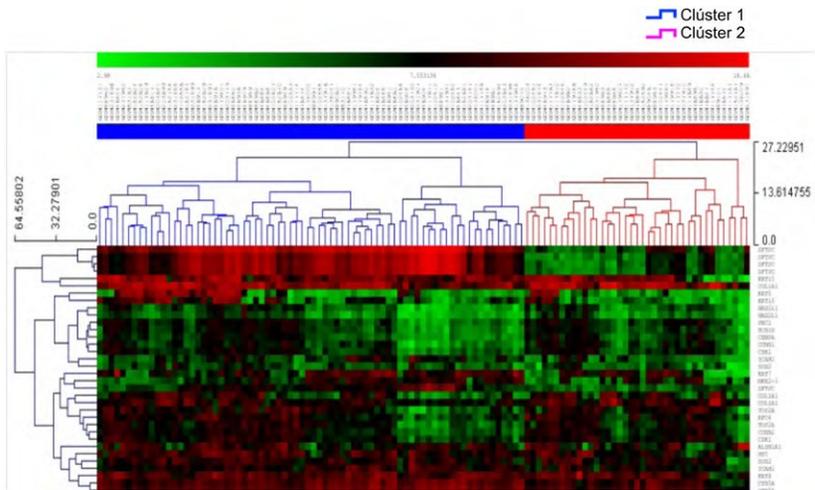


Figura 3. Validación de los genes del metasinature con un conjunto de datos de 117 muestras de cáncer de pulmón de origen primario del conjunto de datos de Bittner. Agrupaciones jerárquicas, clúster 1 (azul) tumoral, clúster 2 (rojo) normal.

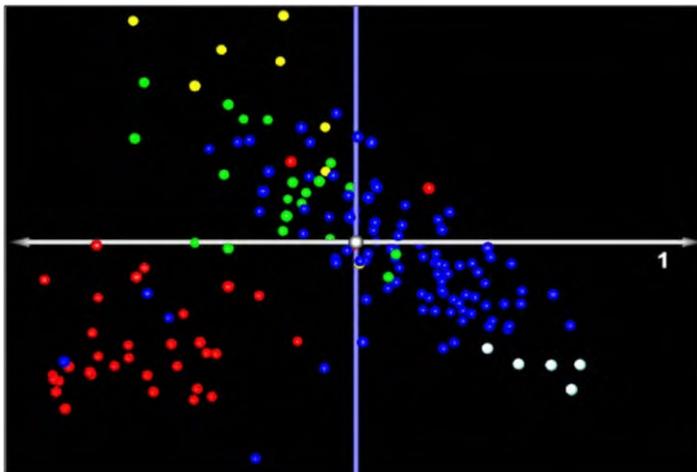


Figure 4. Validación de los genes del metasinature con un conjunto de datos de 163 muestras de cáncer de pulmón de origen primario de Takeuchi y col. (2006), el cual es capaz de diferenciar los tipos histológicos de CP.

El análisis de Kaplan–Meier mostró que el metasignature puede discriminar dos grupos de adenocarcinomas (con buen y mal pronóstico) –aquí denominados como Clúster 1 y Clúster 2–, los cuales poseen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global ($p=0,028$) (**Figura 5A**). Sin embargo, con un análisis adicional en la plataforma BioPlat, se encontraron 13 genes subconjunto de los 34 del metasignature que se asocian con mejor supervivencia global y mejor sobrevida ($p=0,0037$) (**Figura 5B**). Los 13 genes corresponden a: MAD2L1, PTTG1, CCNB1, PGK1, NKX2-1, PLS3, KRT15, PRC1, PCNA, MYC, E2F3, SNRBP y KRT8.

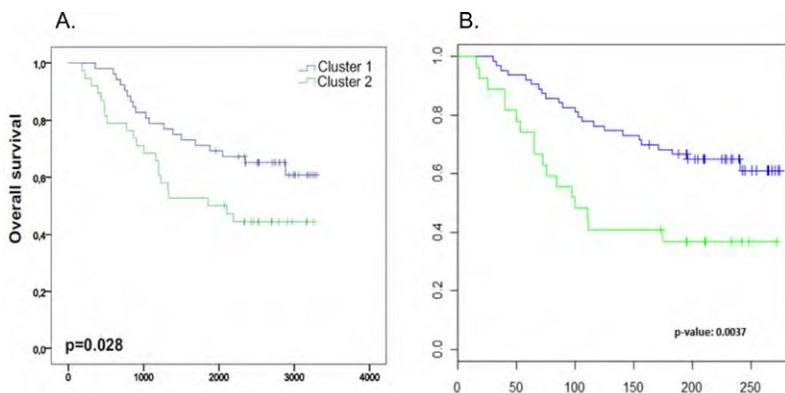


Figura 5. Curvas de Kaplan–Meier de supervivencia global de los genes del metasignature comparados con 163 muestras de pacientes con CP de origen primario obtenidos del estudio de Takeuchi y col. (2006). (A) Supervivencia global de los 34 genes del metasignature. (B) 13 genes subconjunto de los 34 encontrados que son indicadores de supervivencia global con la plataforma BioPlat, que mejoran la supervivencia.

Vías de señalización biológicas enriquecidas (Kegg)

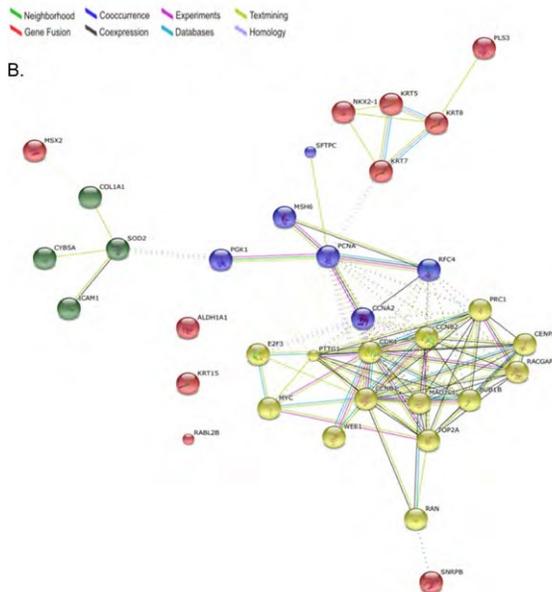
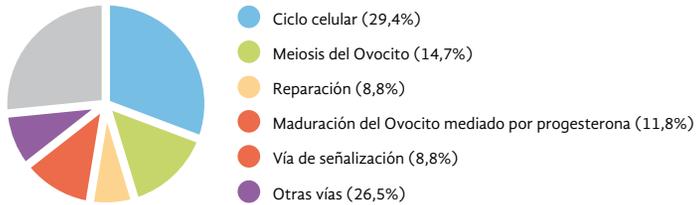
<http://www.genome.jp/kegg>

Las vías de señalización enriquecidas en el metasignature se analizaron con Kegg-Pathway, un recurso bioinformático (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que contiene una colección de mapas de interacciones moleculares y redes de señalización conocidas.

La anotación funcional de los genes evidenció 5 vías de señalización enriquecidas con significancia estadística en el grupo de 34 genes identificados en el “metasignature” (**Tabla 5**). Las vías identificadas fueron: ciclo celular p 5,1 E-11 (E2F3, MAD2L1, WEE, BUB1B, CDK1, CCNB1, CCNB2, PTTG1, PCNA y MYC); meiosis del ovocito 4,0E-4

(MAD2L1, CDK1, CCNB1, CCNB2 y PTTG1), genes de reparación 2,6 E-3 (MSH6, PCNA y RFC4); maduración del ovocito mediada por progesterona 2,7 E-3 (MAD2L1, CDK1, CCNB1 y CCNB2), y la vía de señalización de p53 2,1 E-2 (CDK1, CCNB1 y CCNB2).

A.



B.

La **figura 6A** muestra la red de interacciones proteína-proteína asociada al grupo común de genes a lo largo de las firmas de expresión génica "signatures". La gráfica fue generada con el recurso en línea String, basado en la alta confianza de los datos. La **figura 6B** evidencia fuertes interacciones a lo largo de un grupo de 34 proteínas derivadas del metasinature. La arquitectura de la red sugiere la existencia de tres módulos funcionales (un grupo de genes que actúan en conjunto para cumplir una función específica): a) un módulo relacionado con ciclo celular y reparación (círculos azules y amarillos); b) un módulo relacionado con proteínas de matriz extracelular (círculos rojos), y c) un módulo involucrado en metabolismo celular (círculos verdes).

Módulos de expresión génica asociados con el metasignature

Módulo de ciclo celular y reparación del ADN

El ciclo celular es el conjunto ordenado de eventos que tienen lugar en una célula cuando necesita proliferar ⁽³⁶⁾. En condiciones de homeostasis, tanto la apoptosis como la proliferación son complementarias. La proliferación celular está determinada por la necesidad de un recambio celular en respuesta a la muerte por apoptosis. Este proceso requiere de la orquestación de un grupo de proteínas que controlan la división celular, la interfase y la mitosis. Para esto, la célula presenta puntos de control (checkpoints), que le permiten regular el inicio y terminación de su división celular ⁽³⁷⁾. Estos puntos de control están regulados por diferentes cambios conformacionales de las proteínas que regulan su función, determinando la entrada/permanencia o salida del ciclo celular ⁽³⁸⁾. Sin embargo, si estos puntos de control se encuentran alterados, como ocurre con el cáncer, se favorece la progresión del proceso neoplásico ⁽³⁹⁾.

Como previamente describimos la anotación funcional de 34 genes de metasignature, 20 de ellos se encontraron significativos en ciclo celular (**Figura 6**), ilustrados en círculos amarillos y azules. A continuación se describen las implicaciones de estos genes en CP.

Regulación de la transición G1/S del ciclo celular “E2F3”

Las proteínas E2F se consideran reguladores importantes de la proliferación celular, en especial de la fase de transición G1/S. Estos regulan la actividad transcripcional de genes requeridos para la entrada a la fase S y la síntesis de ADN, transición G1/S ⁽⁴⁰⁾. Los miembros de la familia E2F se subdividen en grupos de acuerdo con sus propiedades transcripcionales; E2F1-3 son potentes activadores transcripcionales y su papel es activar genes blanco (ciclina E, cdc25, wee1), esenciales para la correcta progresión a través del ciclo celular ^(40, 41). E2F4 y 5 están implicados en la “represión” de genes con respuesta a E2F1-3, reclutando proteínas de la familia Rb (p130, 107) y asociándose a histonas deacetilasas. E2F6, 7 y 8 se consideran represores transcripcionales que regulan los genes blanco del factor de transcripción ^(42, 43).

Recientemente se ha descrito que la amplificación y sobreexpresión del gen E2F3 representa un evento oncogénico durante el desarrollo de cáncer de pulmón. Adicionalmente, se ha encontrado sobreexpresión de la proteína E2F3 en tumores de próstata y se ha propuesto un modelo de desarrollo para estos dos tipos de cáncer, en el cual la sobreexpresión de E2F3 coopera con la eliminación del supresor pRB en la transición G1/S del ciclo celular ⁽⁴⁴⁾. Estas alteraciones en la vía de retinoblastoma pRb también se han encontrado en CP y se cree que el 100% de los tumores pulmonares de célula pequeña (SCLC) tienen defectos en esta vía de señalización ⁽⁴⁵⁾.

Los SCLC presentan mutaciones en el gen RB1 en el 90% de los casos, mientras que el 10% restante, inactivación del gen p16 (CDKN2A/INK4a/p16) ^(46, 47, 48, 49). En este

sentido, la eliminación de pRB y la sobreexpresión de E2F3 podrían representar un mecanismo para el desarrollo neoplásico pulmonar.

La sobreexpresión de E2F3 se ha observado en SCLC, en carcinoma neuroendocrino de célula grande (LCNEC) ^(50, 51, 52), en adenocarcinomas y carcinomas escamocelulares (SQC). Sin embargo, no se ha podido detectar una asociación entre los niveles de la proteína E2F3 y el desarrollo de metástasis tumoral, lo que sugiere que la sobreexpresión de la proteína podría representar un evento temprano en el desarrollo del CP.

Es posible que en adenocarcinoma y SCLC, la sobreexpresión nuclear de E2F3 coopere con mutaciones del gen CDKN2A, el cual inactiva al inhibidor de p16 CDK4 y conlleva indirectamente a la inactividad de pRB. A este respecto, Coe y col., han reportado que la baja-regulación de CDKN2A es una característica consistente de los tumores pulmonares de célula no pequeña ⁽⁵³⁾.

Las observaciones de Cooper y col., del alto nivel de expresión de E2F3 en SCLC, junto con las alteraciones del gen RB1, a nivel del RNAm y/o de la proteína codificada, sugieren que este mecanismo podría ser relevante para el desarrollo de CP y que E2F3 podría ser una posible diana terapéutica ⁽⁵⁴⁾.

Regulación del punto de control del huso mitótico MAD2L1, BUB1B y CENP-A

El punto de control del huso mitótico es un mecanismo de vigilancia crucial para mantener el correcto número de cromosomas durante la división celular. Los componentes principales de este punto de control comprenden MAD1, MAD2, BUB1, BUB3, BUBR1 y MPS1. Las alteraciones en el punto de control del huso mitótico se encuentran implicadas en la generación de aneuploidías (ganancia o pérdida de cromosomas completos), lo cual es una característica frecuente en cáncer.

MAD2 es un regulador clave de este punto de control por bloquear la función Cdc20 y reclutar a los sustratos de un complejo ubiquitina ligasa, conocido como el complejo de promoción de la anafase (APC), el cual desempeña un papel importante en la progresión de la mitosis ⁽⁵⁵⁾. La sobreexpresión de MAD2 es un evento común en varios tumores humanos: cáncer de hígado ^(56, 57), cáncer de mama ⁽⁵⁸⁾, sarcoma de tejidos blandos y linfoma de células B. A pesar del hallazgo de altos niveles de expresión de MAD2 en CP, la asociación con los parámetros clínico-patológicos y el pronóstico es desconocido ⁽⁵⁹⁾. Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de MAD2 conduce a la iniciación y progresión del tumor a través de la adquisición de la inestabilidad cromosómica (CIN) en ratones y, por ende, a la aneuploidia ⁽⁶⁰⁾.

La aneuploidia es una característica de la mayoría de tumores humanos, es el resultado de la segregación anómala de cromosomas durante la mitosis. El punto de control del huso retrasa el inicio de la anafase, hasta que todos los cinetocoros se unen al huso mitótico y se alinean en la metafase ⁽⁶¹⁾. El homólogo humano de MAD2 (MAD2L1) fue aislado por primera vez en un tamizaje de número de copias de supresores sensibles a tiabendazol (un inhibidor del ensamblaje del huso mitótico) en levaduras que carecen de CBF1, componente del cinetocoro ⁽⁶²⁾. MAD2 inhibe el complejo promotor de la

anafase (APC) para prevenir la separación de las cromátides hermanas hasta los microtúbulos que irradian desde los polos del huso y se han unido a todos los cinetocoros ⁽⁶³⁾. Varios estudios reportan que MAD2 se encuentra involucrado en la respuesta al daño del ADN, asociándose con la expresión de γ H2AX. Ello sugiere su posible papel en la inhibición de la reparación del ADN en respuesta a rompimientos de doble cadena ^(64, 65, 66).

Además, MAD2 regula al gen E2F manteniendo sus niveles de expresión y asegurando la euploidía.

La segregación cromosómica anómala se ha encontrado en las células generadas a partir de ratones MAD2-knockout ⁽⁶⁷⁾. La delección de un alelo de MAD2 resulta en la alteración del punto de control mitótico en las células humanas de cáncer de colon y fibroblastos primarios embrionarios murinos ⁽⁶⁸⁾. Curiosamente, el alto nivel de expresión de MAD2 parece tener fuertes propiedades mutagénicas. Los tumores de ratones transgénicos MAD2 parecen mucho más agresivos que los de MAD2 de ratones haploinsuficientes ^(60, 68). La sobreexpresión de MAD2 también resulta en la destrucción incompleta de ciclina B y securina en la metafase tardía, que a su vez puede perjudicar la activación de separasa ⁽⁶⁹⁾. Al carecer de una vía Rb funcional, E2F es hiperactivo, lo que resulta en la sobreexpresión de MAD2 en células de cáncer humano y facilita la aneuploidía in vitro. Ello también conduce a la tetraploidización, daño cromosómico estructural, y a la formación de tumores agresivos en un amplio espectro de tejidos y tipos celulares ⁽⁶¹⁾.

La sobreexpresión de MAD2 está asociada con el pobre pronóstico de los pacientes con CP ^(70, 59).

BUB1 es uno de los primeros componentes del punto de control del huso mitótico necesario para ensamblar el cinetocoro naciente en la profase temprana ⁽⁷¹⁾ y es una verdadera proteína del punto de control. El reclutamiento del cinetocoro por BUB1 ocurre a través de la directa interacción entre la repetición tetratricopeptido (TPR) de su dominio N terminal y blinkin (también conocido como hKNL1, AF15q14, D40 y CASC5), miembro de la red de proteínas del cinetocoro ^(72, 73). BUB1 determina el reclutamiento de varios blancos del cinetocoro, incluyendo las proteínas centroméricas E y F (Cenp-E and Cenp-F, respectivamente), BUB3, Mad3/BubR, Mad1 y Mad2 ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾.

Alteraciones en el punto de control del huso mitótico en el gen BUB1, el cual se localiza en el cromosoma 2q14, se han asociado con inestabilidad cromosómica (CIN) en cáncer de colon. Las células que pierden la expresión de BUB1 pueden escapar de la apoptosis, continuando con la progresión en el ciclo celular. En este sentido, a medida que el ciclo celular "alterado" progresa, las células hijas reciben complementos cromosómicos anormales, y se genera la aneuploidía. En líneas celulares carcinoma de colon se han identificado dos mutaciones en el gen BUB1 ⁽⁷⁸⁾, las cuales actúan de manera negativa y conllevan al desarrollo de CIN y a aneuploidía. Sin embargo, existe poca evidencia de la participación de BUB1 en CP.

El centrómero es una estructura especializada de la cromatina, que actúa como una plataforma sobre la cual ocurre la formación de los cinetocoros durante la mitosis y la meiosis ⁽⁷⁹⁾. El cinetocoro sirve como el sitio de unión de los microtúbulos del huso. Varias proteínas y subcomplejos que residen en el cinetocoro cumplen diversas funciones como la regulación de la división celular a través de la activación del punto de control mitótico.

CENP-A es el determinante clave de la formación de centrómero y ensamblaje del cinetocoro⁽⁸⁰⁾. El componente del cinetocoro interno CENP-A es una histona H3 específica del centrómero. CENP-A contiene nucleosomas que pueden ensamblarse in vitro y son más compactos y conformacionalmente más rígidos que los correspondientes heterotetrámeros de las histonas H3-H4^(81,82). En vivo, los nucleosomas de CENP-A se intercalan con nucleosomas H3 en las fibras de cromatina extendidas.

En NSCLC, se ha descrito que CENP-A se localiza en el núcleo y su expresión es positiva en un 65,15% de los tumores; no obstante, en lesiones benignas, la expresión de la proteína es negativa ($P < 0.05$). En los tumores pulmonares bien diferenciados se ha observado expresión en el 38,89%, y en los tumores pobremente diferenciados, 75%, pero disminuye la expresión de la proteína. La expresión de CENP-A es más alta en pacientes fumadores, comparada con los no fumadores, lo que sugiere que podría ser utilizado como marcador de pronóstico en los pacientes con CP (<http://www.res-edical.com/oncology/35797>)

Proteínas del complejo Polycomb y cáncer de pulmón

Las proteínas del grupo Polycomb, el cual se establece durante el desarrollo temprano mediante el control de estructura de la cromatina, mantiene el patrón de expresión génica de las diferentes células. En los mamíferos, existen dos complejos principales del grupo Polycomb: Polycomb represivas 1 (PRC1) y 2 (PRC2). PRC1 compacta la cromatina y cataliza la monoubiquitinación de la histona H2A. PRC2 también contribuye a la compactación de la cromatina y cataliza la metilación (di y tri) de la lisina de la histona H3 (H3K27me2/3)³,⁽⁶⁾ a través de sus subunidades enzimáticas EZH1 y EZH2. PRC2 está implicada en diversos procesos biológicos, incluyendo la diferenciación, el mantenimiento de la identidad celular, la proliferación y la plasticidad de las células madre⁽⁸³⁾.

La expresión de los componentes de PRC2 está incrementada en los diversos tipos de cáncer como el melanoma, el linfoma y el cáncer de mama y de próstata. Se ha descrito que EZH2 es un indicador de las fases agresivas de cáncer de próstata y de mama^(84,85) y su sobreexpresión promueve la transformación neoplásica de células normales⁽⁸⁶⁾ de próstata y la hiperplasia de mama⁽⁸⁷⁾. La expresión de los componentes de PRC2 está regulada por la proteína de retinoblastoma (pRB) y la vía de los factores de transcripción E2F; por lo tanto, se asocia con células en proliferación^(83,88). Además, varios microRNAs controlan la expresión de EZH2. La delección de los componentes de PRC2 en las células somáticas condujo a una reducción marcada en la proliferación celular^(84,88), un efecto que podría estar relacionado con la regulación de PRC2 dependiente del locus de Ink4/Arf (también conocido como el locus CDKN2A), que codifica las proteínas supresoras de tumores p16Ink4a, p19Arf y p15Ink4b^(89,90).

Dados estos hallazgos, se ha propuesto que EZH2 funciona como oncogén⁽⁸⁸⁾. Sin embargo, no existe evidencia de la participación de PRC2 y sus componentes en CP.

Significado clínico de ciclina B1 (CGNB1), ciclina B2 (CGNB2), ciclina A2 (CGNA2) y WEE en cáncer de pulmón

La progresión en el ciclo celular está gobernada por una serie de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Las ciclinas actúan a diferentes fases del ciclo celular por unirse y activar las cdk y juegan un papel importante en el control del ciclo celular ⁽³⁶⁾. Varios complejos ciclinas/cdk involucrados en la regulación del ciclo celular, ciclina D1/cdk4/cdk y ciclina B1/cdc2, son de particular interés porque dirigen la transición G1/S y la fase G2/M y son esenciales para la síntesis de ADN y la proliferación celular. La expresión desregulada de estas ciclinas y cdk podría llevar al crecimiento celular descontrolado y a la transformación maligna.

El complejo ciclina B1/cdc2 está involucrado en la maduración/promoción de la mitosis en la transición G2/M durante el ciclo celular ⁽³⁶⁾. Así, la desregulación de la expresión de ciclina B1 podría estar involucrada en el crecimiento celular descontrolado y en la transformación maligna.

La ciclina B1 es una importante ciclina mitótica en las fases G2 y M del ciclo celular. Su asociación con la forma activa de cdc2 inicia la condensación cromosómica, destrucción de la membrana nuclear y el ensamblaje del uso mitótico. El incremento en la expresión de ciclina B1 es un evento frecuente en las células tumorales; su sobreexpresión se ha demostrado en cáncer colorrectal, próstata, seno, esófago, cabeza y cuello, y en linfoma de Hodgkin y de MALT ⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾. Diferencias significativas en el índice de marcaje de ciclina B1 entre lesiones benignas/premalignas en cáncer de seno sugieren su papel en la transformación maligna de células epiteliales. Sin embargo, se conoce poco del estado de expresión de ciclina B1 en CP y su potencial aplicación clínica. Además, la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se inhibe por la fosforilación del residuo tirosina quinasa 15 (Tyr15) sobre cdc2 ⁽⁹¹⁾. La fosforilación de Tyr15 se lleva a cabo por la quinasa Wee1, una proteína nuclear que retrasa la mitosis hasta la terminación de la replicación del ADN en células con ADN dañado ⁽⁹⁵⁾. En células de carcinoma de colon se ha observado la disminución en la expresión de Wee1, sugiriendo que podría actuar como un supresor de tumores ⁽⁹⁶⁾.

En CP se han observado altos niveles de ciclina B1; se ha reportado como factor pronóstico para este tipo de cáncer, sugiriendo que su expresión podría servir como marcador pronóstico en los pacientes con esta patología.

Ciclina B2 es un miembro de la familia de las ciclinas, específicamente de ciclinas tipo B. Las ciclinas tipo B (B1 y B2) son componentes esenciales en la regulación de la maquinaria del ciclo celular. La ciclina B2 se une al receptor del factor transformante β , y así la ciclina B2/cdc2 podría jugar un papel en el control del ciclo celular mediado por TGF β .

Se han identificado dos miembros de la familia de ciclinas tipo A en humanos: la ciclina A1 (CCNA1) embrionaria-específica y la ciclina A2 ⁽⁹⁷⁾ somática. La ciclina A1 se expresa durante la meiosis en los embriones tempranos, mientras que la ciclina A2 está presente en la proliferación de las células somáticas y juega un papel fundamental en la progresión del ciclo celular. La ciclina A2 se produce en el inicio de la síntesis de ADN

en la proliferación de las células somáticas y promueve el paso a través de la fase G1/S por la formación de un complejo con CDK2.

La ciclina A2 también está presente en la transición G2/M del ciclo celular por activar la quinasa CDK1 y es degradada por la vía de proteólisis dependiente de ubiquitina en las fases tempranas de la mitosis ⁽⁹⁸⁾. La ciclina A2 se expresa ubicuamente en varios tejidos y su sobre-expresión se asocia con la carcinogénesis de diferentes tipos de cáncer. La expresión de CCNA2 en la superficie del esófago de Barrett se encuentra asociada con la progresión de la displasia del esófago a adenocarcinoma ⁽⁹⁸⁾. Se sabe que la expresión de la ciclina A2 aumenta gradualmente desde el tejido normal, a través de la hiperplasia al adenoma, en carcinoma colorrectal temprano ⁽⁹⁹⁾. El aumento de la proteína CCNA2 incrementa significativamente en estados avanzados de cáncer de esófago y aumenta en carcinomas pobremente diferenciados con fuerte invasividad ⁽¹⁰⁰⁾. A pesar de que la amplificación génica de CCNA2 se ha reportado en cáncer de seno con elevada expresión de la proteína, y se conoce que su expresión es inducida por varios factores (c-Myc,12 p53,13 p21waf1/cip1 p57kip2,14 p107 ras y raf16), los mecanismos subyacentes a la sobreexpresión de CCNA2 en los diferentes tipos de cáncer no se ha dilucidado. Se han hallado varios polimorfismos (SNP) en los promotores o los exones de las ciclinas, pero su relación con el riesgo de cáncer no ha sido estudiado extensivamente ⁽¹⁰⁰⁾.

En un estudio de firmas moleculares “signatures” en CP se encontró que el ciclo celular es la vía mayormente alterada (P = 0.044), con cuatro genes significativamente asociados, entre los que se incluye CCNA2 (PLA2G6 P = 0.001, CCNA2 P = 0.006, GSK3 beta P = 0.007 y EGF P = 0.013). Es de anotar que la mayoría de genes del ciclo celular asociados a CP pertenecen a la vía AKT, esencial en la regulación de la progresión del ciclo y la supervivencia celular, y pueden ser importantes en la etiología de este tipo de cáncer ⁽¹⁰¹⁾.

Varios autores sugieren que el papel oncogénico de las ciclinas se encuentra relacionado con los cambios en sus patrones de expresión a través del ciclo celular ⁽¹⁰²⁾. Independientemente de la causa, la presencia continua de las ciclinas puede generar la activación de las quinasas asociadas (CDK). Esto, a su vez, podría conducir a la fosforilación de varias proteínas y pasar por los respectivos puntos de control.

Relevancia pronóstica de la expresión de PCNA en cáncer de pulmón

El pronóstico clásico de CP incluye factores como el estadio del tumor, el estado funcional y la pérdida de peso en los pacientes. El papel pronóstico de los nuevos marcadores tumorales, como la ploidía del ADN, marcadores de proliferación (PCNA) y mutaciones de los genes supresores tumorales o proto-oncogenes siguen siendo motivo de controversia ⁽¹⁰³⁾.

La alteración molecular más común en CP es la mutación del gen supresor p53 ^(104, 105). Esta anomalía ocurre también en otros tumores como colon, seno e hígado ⁽¹⁰⁶⁾. El gen p53 se encuentra involucrado en ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, diferenciación celular, senescencia y angiogénesis ⁽¹⁰⁷⁾. El nivel de la proteína p53 aumenta

en el núcleo después de exponer a las células a estrés, lo cual incluye daño del ADN, hipoxia y daño oxidativo^(105, 107). El valor pronóstico de p53 en CP es polémico^(108, 106): algunos autores reportan corta supervivencia en los pacientes con mutaciones en este gen⁽¹⁰⁹⁾, donde otros no encuentran correlación⁽¹¹⁰⁾. El papel de p53 en proliferación celular ha impulsado la búsqueda de otros marcadores de ciclo celular posiblemente correlacionados con la expresión de p53. Un ejemplo de ellos es el antígeno de proliferación nuclear (PCNA)^(111, 112).

PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) es una proteína no-histona de 36 Kd y de 261 aminoácidos con alto contenido de ácido glutámico y aspartato⁽¹¹³⁾. Esta proteína se encuentra involucrada en un amplio rango de funciones celulares que incluyen: replicación del ADN, reparación y mantenimiento epigenético, y además es usado como marcador de diagnóstico y pronóstico^(114, 115). PCNA, también conocido como ciclina o proteína auxiliar para la ADN polimerasa δ y de la ADN polimerasa ϵ ^(116, 117), está asociada con la replicación del ADN y la proliferación celular⁽¹¹⁷⁾. La expresión de PCNA se incrementa al final de la fase G1, llega al máximo en la fase S, disminuye durante la fase G2 y es ausente durante la fase mitótica y en células quiescentes^(115, 117). PCNA fue identificado en pacientes con lupus eritematoso^(118, 119). La inmunorreactividad nuclear de PCNA se ha utilizado como un marcador de índice de proliferación en varios tumores, incluyendo CP⁽¹¹⁹⁾. Desde que se describió la utilización de PCNA como marcador de proliferación celular, ha sido relacionado con la agresividad tumoral^(117, 118), invasión vascular⁽¹¹⁹⁾ y comportamiento clínico^(115, 117).

Algunos estudios han demostrado que la expresión de PCNA constituye un marcador de mal pronóstico de los pacientes con CP y otras neoplasias^(112, 118, 120). Además, se ha sugerido que p53 puede regular al tanto la expresión del ARNm como la expresión de la proteína, mientras que mutaciones en p53 puede activar directamente el promotor⁽¹¹⁶⁾.

A pesar del gran número de datos científicos que describen la función de p53 y la expresión de PCNA en CP, algunos aspectos de este problema han quedado sin resolverse. En primer lugar, se debate la asociación entre las ocurrencias de p53 y PCNA en células tumorales, así como el valor pronóstico de ambas proteínas. Por otra parte, la mayoría de los estudios analizan el valor pronóstico de p53 y PCNA como variables independientes, mientras que su expresión combinada no ha sido investigada a fondo. Este aspecto parece relevante dadas las posibles interacciones entre las dos proteínas.

Topoisomerasa II (TOPA2) y resistencia en cáncer de pulmón

Las alteraciones de la topoisomerasa II son un ejemplo de cómo una variación en la diana molecular de los fármacos puede ser causante de resistencia a múltiples medicamentos. La resistencia ligada a estas enzimas ha sido ampliamente estudiada a nivel experimental⁽¹²¹⁻¹²⁴⁾. Algunos autores la denominan resistencia “atípica” a múltiples fármacos⁽¹²⁵⁾, ya que consideran “típica” o “clásica” la relacionada con la proteína Pgp. Las topoisomerasas son enzimas muy importantes en el metabolismo del ADN, en tanto lo rompen de forma controlada y posteriormente vuelven a unir las cadenas de nucleótidos⁽¹²⁴⁾. Existen dos tipos de topoisomerasas: la I y la II. La I rompe una sola cadena, mientras la II rompe ambas cadenas a la vez. Las rupturas del ADN permiten el paso

de una cadena a través de la otra, lo cual es imprescindible para mantener la homeostasis de la arquitectura y dinámica de la doble hélice durante los diversos procesos de replicación y expresión génica. Las isoformas de la topoisomerasa II se denominan α y β ⁽¹²⁶⁾. Estas presentan una regulación diferente y sus propiedades y probablemente sus funciones también lo son. Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se fijan a ellas y al ADN, estabilizando y bloqueando las rupturas de la cadena.

Al impedirse el restablecimiento de la integridad del ADN, se inicia el proceso de la muerte celular ⁽¹²⁷⁾. El topotecán y el irinotecán o CPT11 son fármacos inhibidores de la topoisomerasa I, y las epipodofilotoxinas como el VP16 o etopósido y el VM26 o tenipósido, las antraciclinas y otros como el mitoxantrone y la dactinomicina inhiben de la topoisomerasa II. Varios de estos medicamentos se emplean en el tratamiento del CP ^(128, 129). Hay evidencia de que los niveles de topoisomerasa II α en carcinomas escamosos, adenocarcinomas y carcinomas de células grandes de pulmón son menores que en los carcinomas de células pequeñas, lo que podría contribuir a su diferente sensibilidad a la quimioterapia ⁽¹²³⁾. Las alteraciones de la topoisomerasa II α pueden jugar un papel en la resistencia a la quimioterapia del CP, pero los estudios clínicos, en general, no encuentran relación con la respuesta a la quimioterapia ni con otras variables clínicas ⁽¹³⁰⁾. A pesar de ello, algunos estudios han detectado una menor supervivencia en los pacientes que presentan altos niveles de topoisomerasa II α ⁽¹³⁰⁾.

Familia de proteínas Ras GTPasas

En las últimas décadas se han descrito vías y elementos involucrados en la señalización celular, entre los cuales se encuentran las proteínas Rho GTPasas. Las proteínas Rho forman una de las subfamilias de la superfamilia Ras de GTPasas. Los más de cincuenta miembros de dicha superfamilia se agrupan en función de la homología en su composición de aminoácidos en las siguientes subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran ⁽¹³¹⁾. Estas proteínas tienen pesos moleculares semejantes (20-25 kDa) y se denominan genéricamente "GTPasas pequeñas" (small GTPases o small GTP-binding proteins). Así, se diferencian del resto de las proteínas con actividad GTPasa como las proteínas G heterotriméricas.

Las Ran GTPasas son proteínas expresadas en varios tumores humanos y presentan bajos niveles en la mayoría de tejidos normales. El silenciamiento de Ran en las células tumorales provoca defectos en el ensamblaje del huso mitótico, disfunción mitocondrial y apoptosis. La señalización de Ran-GTP está presente en el ensamblaje del huso acromático ⁽¹³²⁾ liberando moléculas blancas como TPX2 ⁽¹³³⁾, el cual afecta la dinámica del microtúbulo y promueve la formación del huso. La evidencia sugiere que esta vía puede ser estudiada y aplicada en cáncer. Varios efectores de Ran se han caracterizado como genes de cáncer, diferencialmente expresados o mutados en las células transformadas, e incluye a la quinasa oncogénica Aurora A ⁽¹³⁴⁾ y un complejo de proteínas de reparación del ADN BRCA1/BARD1, que cumple funciones críticas en la integridad genómica ⁽¹³⁵⁾.

Influencia del gen transformante de tumores de pituitaria PPTG1 en cáncer de pulmón

Los progresos en la investigación en cáncer a nivel molecular han llevado al descubrimiento y mejor entendimiento de los genes involucrados en el desarrollo neoplásico. En 1997 se identificó un nuevo proto-oncogén en las células tumorales de la pituitaria que secretan la hormona de crecimiento, asociado con fenotipo maligno ⁽¹³⁶⁾. Se le llamó gen de transformación tumoral en la pituitaria (PTTG1). Consiste en una proteína de 23 kDa con 202 aminoácidos, localizada sobre el cromosoma 5q33, un locus asociado previamente con progresión de CP ⁽¹³⁷⁾. PTTG-1 se expresa fisiológicamente en diferentes órganos (testículo, colon y pulmón), mientras que la sobreexpresión se ha observado en varios tumores malignos y líneas celulares tumorales, en los que se incluyen carcinomas del tracto gastrointestinal, seno, pulmón, en leucemia y linfoma. El posible papel de PTTG-1 como proto-oncogén se evidenció cuando la línea celular de fibroblastos NIH 3T3 fue transfectada con la secuencia codificante completa del PTTG-1. La transfección condujo a cambios morfológicos, a alteraciones en el crecimiento de fibroblastos y a la formación del tumor cuando se inyectó en ratones.

Algunas investigaciones sugieren que PTTG-1 actúa en la regulación de la transcripción ⁽¹³⁸⁾, tal como la inducción de factor de crecimiento básico de fibroblastos (Zhang y col., 1999) o la activación de c-Myc ⁽¹³⁹⁾, lo cual conduce al aumento de la angiogénesis y proliferación celular de PTTG-1 ⁽¹³⁹⁾.

Se ha observado que la sobreexpresión de PPTG-1 se asocia con un pronóstico favorable (3,5 meses) de los pacientes con CP de célula pequeña (SCLC). En contraste, los pacientes con CP de célula no pequeña (NSCLC) con sobreexpresión de PPTG-1 tienen un mal pronóstico (5,2 meses), comparado con personas sanas.

Estos resultados reflejan la diversidad de funciones que cumple PTTG-1 en la fisiopatología de los diferentes subtipos histológicos de CP, como lo reportan estudios recientes donde la sobreexpresión de PTTG-1 se relaciona con la inducción de apoptosis mediada o no por p53 en células de cáncer de seno ⁽¹⁴⁰⁾. La expresión de PTTG-1 incrementa la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Varios estudios asocian la sobreexpresión de PTTG-1 con la inestabilidad cromosómica, incremento de la angiogénesis y metástasis e invasividad tumoral ⁽¹⁴¹⁾ como causa de un fenotipo tumoral agresivo. Además, este gen se correlaciona significativamente con un diagnóstico desfavorable de los pacientes con NSCLC, metástasis a nódulos linfáticos, presencia de metástasis a distancia e incrementos en los niveles de LDH. En este sentido, PTTG-1 obedece a los requerimientos de un biomarcador en pacientes con NSCLC. En este contexto, PTTG-1 podría ser utilizado como un marcador predictivo para la toma de decisiones en pacientes con NSCLC que podrían ser tratados con quimioterapia adyuvante o radiación después de la confirmación por histopatología.

En conclusión, las funciones de PTTG-1 son complejas y podrían diferir en cada célula tumoral, como lo indica la diferencia en la supervivencia de pacientes con sobreexpresión del gen, dependiendo del subtipo histológico. Estos hallazgos muestran la importancia de PTTG-1 en la biología de CP.

Familia de genes MYC y cáncer de pulmón

Esta familia conformada por los genes MYC, MYCN (aislada de neuroblastoma) y MYCL1 (aislada de CP) codifica una serie de factores de transcripción que activan la síntesis de ADN, el metabolismo del ARN y la progresión del ciclo celular. En carcinoma de pulmón se han detectado alteraciones en los tres miembros de la familia. El mecanismo general de alteración es la amplificación y por lo tanto su sobreexpresión proteica, correlacionada con la regulación de un set de genes, principalmente proapoptóticos y antiapoptóticos. Ello soporta la idea de un balance alterado de la apoptosis en SCLC regulado en parte por los genes MYC ⁽¹⁴²⁾.

Los oncogenes de la familia MYC tienen la capacidad de cooperar con otros oncogenes como Ras y Bcl-2 en relación con diversos procesos implicados en la tumorigénesis ⁽¹⁴³⁾.

El impacto terapéutico y el efecto de la inhibición sistémica de los MYC se analizaron en un modelo de ratón con adenocarcinoma de pulmón inducido por Ras. Así, se comprobó que la inhibición de estos factores de transcripción provoca una rápida regresión de tumores nacientes y establecidos en pulmón, lo que indica que participan en el mantenimiento de tumores in vivo, dependientes de Ras. Igualmente, se observó que esta inhibición tiene un efecto negativo en la regeneración de tejido normal, aunque estos efectos son bien tolerados y completamente reversibles. Esto demuestra la eficiencia de inhibición de MYC, MYCN y MYCL1 en la terapia de CP ⁽¹⁴⁴⁾.

MYC (“Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog”) o c-Myc, ubicado en 8q24.12-q24.13, contiene tres exones. El gen MYC codifica un factor de transcripción pleiotrópico con estructura bHLHZ (basic-Hélice-Loop-Hélice/leucine-Ziper) que coordina la expresión de diversos programas intra y extracelulares necesarios para el crecimiento y expansión de células somáticas ⁽¹⁴⁵⁾.

MYC promueve la proliferación y transformación celular por activación de genes involucrados en crecimiento celular. Induce transcripción de los genes E2F1, E2F2 y E2F3 y asimismo requiere de estos para inducir las células a fase S (E2F2 o E2F3) y a apoptosis (E2F1). Para que MYC pueda realizar activación génica requiere formar un complejo heteromérico con proteínas MAX y MAD, el cual se une a secuencias E-box (5' -CACG-TG-3'). El reconocimiento de las cajas E-box determina si la célula se divide y prolifera (MYC-MAX) o si se diferencia y entra en quiescencia. La desregulación de MYC ha sido implicada en el desarrollo de muchos tipos de cáncer, incluyendo linfoma de Burkitt, neuroblastomas y CP ⁽¹⁴⁶⁾.

Se ha demostrado que también participa en el control de la replicación de ADN, interactuando con complejos prerreplicativos. La sobreexpresión de MYC causa incremento de actividad en los orígenes de replicación con subsecuente daño del ADN y activación de puntos de chequeo ⁽¹⁴⁷⁾.

La proteína MYC se sobreexpresa en varios tipos de cáncer: mama, colon, carcinoma hepatocelular, tumores hematológicos y CP ⁽¹⁴⁸⁾.

MYCN (“Avian Myelocytomatosis Viral-Related Oncogene, Neuroblastoma-Derived”), ubicado en 2p24.1 y compuesto por 6.447 bases, codifica 464 aminoácidos que conforman este factor de transcripción, miembro de la familia Myc, es una proteína nuclear, al

igual que MYC forma heterodímeros con la proteína MAX. Esta interacción es esencial para la activación transcripcional, inducción de la progresión del ciclo celular y transformación celular ⁽¹⁴⁹⁾.

Se ha demostrado que MYCN puede sustituir la función de MYC durante la embriogénesis, indicando que los dominios funcionales de MYCN son implícitamente idénticos a los de MYC ⁽¹⁴⁸⁾.

MYCN se ha visto amplificado de 25 a 700 veces en 8 de 9 líneas celulares de neuroblastoma, y también se ha visto amplificado en retinoblastoma y CP ⁽¹⁵⁰⁾.

MYCL1 (“Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog 1, Lung Carcinoma-Derived”), compuesto por 3 exones, está ubicado en 1p34.3. Miembro de la familia Myc, homólogo de MYCN y MYC, se ha asociado a sus mismas funciones, principalmente regulación del ciclo celular, proliferación, apoptosis y diferenciación celular ⁽¹⁴⁸⁾.

Se ha visto sobreexpresado en CP y se correlaciona con la regulación de varios genes con funciones neuronales conocidas como NEFL, PRSS12. Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) en MYCL1 en CP indican que este gen puede ser un marcador de metástasis ⁽¹⁵¹⁾.

Fosfoglicerato quinasa (PGK1) y cáncer de pulmón

La fosfoglicerato quinasa PGK1 es una enzima requerida en el sexto paso de la vía glicolítica de los mamíferos. Cataliza la transferencia de fosfatos entre la posición 1 de 1,3-bisfosfoglicerato y γ -fosfato de Mg-ATP. Sin embargo, las evidencias han mostrado que es una molécula multifuncional. PGK-1 puede afectar la replicación y reparación del ADN en el núcleo ⁽¹⁵²⁾ y estimular la síntesis del RNA viral en el citosol. Esta enzima también puede actuar como una proteína de unión al RNA y estar involucrada en la regulación postranscripcional del RNA del receptor activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR). Se ha reportado que la sobreexpresión de PGK-1 reduce la expresión de uPAR en las células. Además, PGK-1 puede actuar en la inhibición de la angiogénesis tumoral por promover la formación extracelular de angioestatina desde plasmina ⁽¹⁵³⁾. Péptidos de PGK-1 pueden aumentar la citotoxicidad de los infiltrados de linfocitos T aislados de cáncer de colon por estimular la expresión de IFN- γ ⁽¹⁵²⁾. En consecuencia, puede considerarse a PGK-1 una molécula blanco candidata para realizar inmunoterapia específica de cáncer.

Otro estudio encontró que los niveles del RNA de PGK-1 se asocian con pobre supervivencia de tumores pulmonares en suero. La expresión de PGK1 refleja el incremento de la glicólisis en las células tumorales y actúa como catalizador de la conversión reversible de 1,3, difosfoglicerato a 3-fosfoglicerato con la generación de una molécula de ATP. Al mismo tiempo, se ha reportado que PGK1 induce resistencia a múltiples fármacos ⁽¹⁵⁴⁾. El incremento en la expresión de los genes involucrados en la glicólisis se ha relacionado con el potencial metastásico de líneas celulares de cáncer de colon ⁽¹⁵⁵⁾.

Genes de reparación (MSH6, PCNA y RFC4)

Reparación del ADN y GP

La exposición al humo del tabaco y los xenobióticos mutagénicos causan varios tipos de daño en el ADN de las células pulmonares ⁽¹⁵⁶⁾. Las lesiones y mutaciones que surgen de ellos pueden conducir a alteraciones en el programa normal del ciclo celular y crecimiento, y favorecer el desarrollo de cáncer. Para esto, las células contrarrestan los efectos nocivos del ADN dañado a través de diferentes vías y estrategias de reparación, incluyendo el control del ciclo celular y la inducción de apoptosis ⁽¹⁵⁷⁾.

La vía de “reparación por escisión de bases” (BER) es el principal mecanismo para eliminar las bases incorrectas o dañadas, incluso las formadas por especies reactivas de oxígeno (por ejemplo 8-hydroxyguanine) y agentes de metilación (por ejemplo, 7-metilguanina y 3 metiladenina) ⁽¹⁵⁸⁾. La vía de reparación de apareamientos erróneos (MMR) corrige los errores de replicación del ADN que escapan a las funciones de corrección de las ADN polimerasas. Este mecanismo se ha relacionado con la activación de punto de control del ciclo celular y la muerte celular, y por lo tanto las alteraciones en este proceso pueden tener consecuencias para la célula ⁽¹⁵⁹⁾.

RFC4 es una proteína que se une en un complejo con el antígeno nuclear de proliferación (PCNA) para regular el alargamiento de las plantillas de ADN por las ADN polimerasas ^(160, 161). Este complejo también funciona en la reparación del ADN no programada y en la comprobación del punto de control a través de interacciones con el complejo de ADN Rad17 911. Se ha descrito que PKC δ regula la expresión de RFC4, sugiriendo que PKC δ puede modular la síntesis de ADN y el punto de control de ADN dañado en las células tumorales.

Rohrbeck y col. (2008) reportó la sobreexpresión de RFC4 en carcinoma escamocelular de pulmón ⁽¹⁶²⁾.

La función primaria del sistema de reparación MMR es eliminar los errores de no apareamiento correctos de una sola base y los bucles de inserción-delección que podrían surgir durante la replicación del ADN ⁽¹⁶³⁾. Bucles de inserción/delección resultan de ganancias o pérdidas de pequeñas unidades repetidas dentro de las secuencias de los microsatélites, también conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI). Para esto, se requieren al menos seis diferentes proteínas MMR. Para el reconocimiento del no apareamiento correcto de las bases, la proteína MSH2 forma heterodímeros con MSH6 o MSH3, dependiendo del tipo de lesión que debe ser reparado (MSH6 se requiere para la corrección de desapareamiento de una sola base donde MSH3 y MSH6 podrían contribuir a la corrección de bucles de inserción/delección). Un heterodímero de MLH1 y PMS2 coordina la interacción entre el complejo de reconocimiento de desapareamiento y otras proteínas necesarias para MMR.

Estas proteínas adicionales pueden incluir al menos exonucleasa 1 (EXO1), posiblemente helicinas, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína de unión al ADN de cadena sencilla (RPA) y ADN polimerasas.

Se han descrito mutaciones en MSH6 para cáncer colorrectal, cáncer de seno⁽¹⁶⁴⁾, próstata⁽¹⁶⁵⁾ vesícula⁽¹⁶⁶⁾ y esófago⁽¹⁶⁷⁾, pero no hay reportes en cáncer de pulmón⁽¹⁶⁸⁾.

Módulo de proteínas de matriz extracelular y metabolismo celular

Relevancia de las citoqueratinas y TTF-1 (NKX2-1) en cáncer de pulmón

Los marcadores tumorales en suero tienen varias aplicaciones potenciales en la clínica oncológica. Estas incluyen tamizaje, diagnóstico y pronóstico. Sin embargo, los marcadores tumorales en suero pueden ser de gran ayuda durante el monitoreo a la respuesta a terapias anticáncer y para evaluar el curso de la enfermedad⁽¹⁶⁹⁾. Los marcadores tumorales pulmonares componen un grupo heterogéneo de moléculas con un amplio rango de aplicaciones clínicas. Entre ellos, los productos de degradación de las citoqueratinas es el grupo más promisorio⁽¹⁷⁰⁾.

Las queratinas epiteliales, o citoqueratinas (CK), constituyen una familia de 20 polipéptidos que se distinguen por su peso molecular y punto isoeléctrico. Se dividen en dos grupos: las tipo 1 (CK9-20), las cuales son polipéptidos ácidos pequeños, y las tipo 2 (CK1-8)⁽¹⁷¹⁾. La familia de las citoqueratinas se expresa en las células epiteliales y constituye un marcador útil de la diferenciación epitelial. La expresión de cualquiera de las citoqueratinas o una combinación de ciertas citoqueratinas son tejido específicas. Por ejemplo, las citoqueratinas 7 y 8 son altamente expresadas en el epitelio de tráquea y urotelio. Durante la transformación maligna de las células epiteliales normales, los patrones de citoqueratinas se mantienen; así, las citoqueratinas más abundantes en carcinomas son la CK7, 8, 18, 19 y se encuentran en el epitelio simple⁽¹⁷²⁾. Las CK se encuentran intratumoralmente y en la sangre, donde circulan como complejos parcialmente degradados⁽¹⁷²⁾ y se depositan en el tumor, haciendo de estas sustancias blancos potenciales para radioinmunodetección y radioinmunoterapia, mientras que sus fragmentos proteolíticos son solubles y pueden ser medidos en suero y otros fluidos biológicos⁽¹⁷²⁾.

La clasificación histopatológica de carcinoma pulmonar es importante como factor pronóstico para la evaluación de las modalidades de tratamiento. No obstante, la clasificación de esta patología por la organización mundial de la salud (OMS) se basa en análisis microscópico e inmunohistoquímica.

En 1984, Blobel y col., demostraron por inmunofluorescencia y electroforesis en dos dimensiones que las células alveolares de CP contenían citoqueratinas (CK), polipéptidos típicos del epitelio (CK7, 8, 18, and 19). Por otra parte, las células basales del epitelio bronquial expresan CK5 y pequeños aumentos de CK6. Los autores también encontraron en el epitelio tipo simple citoqueratinas en todos los adenocarcinomas (AC) y en los carcinomas de célula pequeña (SCLC) (Blobel y col., 1985), mientras que en los carcinomas escamocelulares (SCC) presentan un fenotipo más complejo de citoqueratinas (CK5, 6, 8, 13, 17, 18, y 19). Los carcinomas escamocelulares (carcinoma epidermoide) tienen un fenotipo CK5+/TTF-1-, y al menos el 20% son positivos para CK7. La mayoría de carcinomas no epidermoides tienen el fenotipo específico de pulmón CK5-/TTF-1+, y todos los carcinomas de células pequeñas, el fenotipo CK5-/CK8+/TTF-1+, los adenocarcinomas CK5-/CK7+/TTF-1+, y los carcinomas de célula grande CK5-/CK7+/TTF-1+ (173).

TTF-1 es una proteína de transcripción nuclear expresada por un gen de la familia NKx 2 que se identifica en las células epiteliales embrionarias del pulmón y de la glándula tiroidea. TTF-1 se ha utilizado con fines diagnósticos, ya que es detectado inmunohistoquímicamente en carcinomas de tiroides y pulmón ⁽¹⁷⁴⁾. TTF-1 interviene en la activación de los genes de la tiroglobulina y la tiroperoxidasa en las células foliculares tiroideas y de pulmón, en los genes que codifican las proteínas A, B y C del surfactante pulmonar, así como también de las proteínas de las células claras del alvéolo pulmonar ⁽¹⁷⁵⁾. El Factor 1 de Transcripción Nuclear Tiroideo (TTF-1) ha resultado ser bastante específico para ser utilizado en el inmunomarcaje de los tumores de origen pulmonar, especialmente en los adenocarcinomas no mucinosos y en los tumores de células redondas.

Los tratamientos modernos antineoplásicos han conducido al aumento de la sobrevivencia de los pacientes con cáncer, y cada vez se estimula más el interés por el dilema frecuente del verdadero origen de los tumores solitarios o múltiples en el pulmón. El valor de la inmunohistoquímica para esclarecer el diagnóstico de tumores pulmonares en pacientes tratadas por cáncer de mama es un ejemplo muy frecuente de esta situación ⁽¹⁷⁶⁾. Las ventajas de la inmunohistología para diagnosticar los tumores metastáticos en sitios extrapulmonares se favorecen con el Factor de Transcripción Nuclear (TTF-1), capaz de inmunomarcarse los núcleos de al menos el 76% de los casos de tumores de origen pulmonar.

Colágeno en CP

Colágeno I (Col-Ia1) es el mayor componente fibrilar de muchos tejidos, como la piel, hueso, ligamento y otros tejidos blandos. Es un heterodímero que tiene dos cadenas idénticas: $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Estas cadenas alfa son sintetizadas como precursoras o pro-cadenas con terminaciones amino terminal (PINP) y carboxilo terminal (ICTP) llamadas polipéptidos. Luego de la secreción celular, los polipéptidos son proteolíticamente removidos para producir monómeros de colágeno "telopéptidos". Estas regiones de telopéptidos juegan un papel importante en el entrecruzamiento intermolecular de los monómeros de colágeno, y son liberados durante la digestión enzimática del colágeno tipo I maduro en los tejidos humanos ⁽¹⁷⁷⁾. Se ha reportado que los niveles de PINP e ICTP se incrementan en los pacientes con CP comparado con controles sanos, lo que

sugiere que la resorción y formación de colágeno de tipo I son procesos que ocurren simultáneamente en pacientes con carcinoma de pulmón y las células tumorales inducen la lisis celular de colágeno tipo I.

La concentración de colágeno tipo I (Col-Ia1) se correlaciona con la agresividad de los tumores malignos de carcinoma de seno ⁽¹⁷⁸⁾ y la invasividad tumoral se correlaciona con su habilidad de degradar componentes de la matriz extracelular. Se ha demostrado que los niveles de colágeno en suero están asociados con el tamaño tumoral y con el estado clínico de la enfermedad en los pacientes con CP. Estas observaciones sugieren la posibilidad de aplicar la proteína como marcador potencial de agresividad y como predictor de los resultados de los pacientes en carcinoma pulmonar ⁽¹⁷⁹⁾.

Proteína surfactante C (PS-C) para la detección de CP en sangre periférica

En el pulmón se sintetizan fosfolípidos y proteínas que de forma conjunta rebajan la tensión superficial alveolar, evitando que ocurra una atelectasia al final de la espiración. Aunque los lípidos son los que ejecutan la acción directa sobre la tensión superficial, hay varias proteínas que regulan esa actividad surfactante ⁽¹⁸⁰⁾. Hasta ahora se han identificado dos glicoproteínas de la familia de las colectinas, denominadas surfactantes A y D (PS-A y PSD), y otras dos pequeñas proteínas, muy hidrofóbicas: la PSB y la PS-C ⁽¹⁸¹⁾. La PS-C está codificada por un gen de unos 3.500 pb con 6 exones, situado en el brazo corto del cromosoma 8, que se transcribe en un RNAm de unos 900 pb. La proteína codificada tiene 191 aminoácidos y corresponde a la proteína PS-C, que posteriormente se modifica para convertirse en la forma activa (PS-C) de 34 aminoácidos en los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II ⁽¹⁸²⁾.

Previos reportes han mostrado que el RNAm de la proteína surfactante A y C se detecta en efusiones pleurales de pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Estas evidencias hacen pensar que el RNAm de estas proteínas podría ser un marcador molecular potencial para detectar células de carcinoma en la sangre periférica de los pacientes.

Otros autores han descrito que el RNAm tanto de la proteína surfactante A como de la C se ha identificado en pacientes con CP de célula no pequeña (NSCLC), sugiriendo que estas proteínas son altamente específicas para detectar marcadores primarios de cáncer ⁽¹⁸³⁾.

Cáncer de pulmón invasivo y expresión de la molécula de adhesión 1 (ICAM-1)

Las células tumorales que hacen metástasis presentan alteraciones morfológicas y moleculares para invadir los tejidos vecinos. La invasión puede estar facilitada por la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) ⁽¹⁸⁴⁾. ICAM-1 es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas y su expresión es

esencial para la migración transendotelial de los linfocitos desde los capilares a los tejidos. En tumores malignos, la expresión de ICAM-1 se ha asociado con lesiones agresivas en melanoma, cáncer gástrico, de seno, de pulmón y otros tipos de cáncer epiteliales^(184, 185). Los niveles de ICAM-1 en suero se incrementan en pacientes con NSCLC⁽¹⁸⁶⁾ y niveles elevados se han correlacionado con el estado avanzado de la enfermedad⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁹⁾. Histológicamente, los niveles de expresión de ICAM-1 en los tejidos de tumores pulmonares son proporcionales al estado del tumor y se encuentran asociados con la metástasis a nódulos linfoides^(189, 190).

El papel de las moléculas de adhesión en la patogénesis, diagnóstico y pronóstico de cáncer ha sido intensamente investigado. En CP, ICAM-1 y E-cadherina son reconocidas como marcadores en suero, y a nivel celular, en la transformación maligna y metástasis. ICAM-1 es inducible en el microambiente inflamatorio tumoral. Anticuerpos que bloquean ICAM-1 resultan en la inhibición de la invasión, sugiriendo su aplicación terapéutica^(184, 186).

Expresión diferencial de la enzima superóxido dismutasa (SOD2) en cáncer de pulmón

La primera línea de protección del cuerpo contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluye la participación de tres enzimas superóxido dismutasas (SOD) que convierten los radicales superóxidos a peróxido y oxígeno (Kinnula y col., 2003). Todas las isoformas de SOD (SOD1 (CuZnSOD), SOD2 (MnSOD) y SOD3 ECSOD) se han identificado en tejido pulmonar humano. Estudios en ratones transgénicos y knockout han sugerido que MnSOD (SOD2) es la enzima más importante in vivo⁽¹⁹¹⁾. Sin embargo, la importancia relativa de estas enzimas intracelulares (MnSOD, CuZnSOD) y extracelulares (ECSOD) en pulmón humano y enfermedades malignas pulmonares no está bien entendida.

El cigarrillo es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el pulmón, y estas pueden dañar el ADN, las proteínas y los lípidos, hasta conducir eventualmente al desarrollo de cáncer. Varios estudios demuestran que altas concentraciones de antioxidantes en la dieta se encuentran asociados con bajo riesgo de CP⁽¹⁹²⁾. La enzima manganeso superóxido dismutasa (SOD2) cataliza la dismutación de los radicales superóxido (una forma de ROS) en peróxido de hidrógeno y juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo en tejidos pulmonares^(191, 193). Debido a su función en el metabolismo celular, las mitocondrias son el sitio principal para la producción de ROS. SOD2 es la única enzima captadora de superóxidos en la mitocondria, y por lo tanto podría ser importante en la regulación de los niveles de ROS. La mitocondria cumple una importante elemental en apoptosis y proliferación celular, y SOD2 podría estar involucrada directamente en carcinogénesis para proteger contra el daño mitocondrial⁽¹⁹⁴⁾.

Se ha descrito que el genotipo Val/Val de SOD, polimorfismo Ala16Val puede aumentar el riesgo de desarrollar CP, puesto que corresponde a la baja eficiencia de SOD2 de

transportar a la mitocondria y disminuir los altos niveles de ROS, y por ende el incremento de los daños en el pulmón ⁽¹⁹⁵⁾.

Svensk y col. (2004) describieron que la expresión de SOD en tumores pulmonares humanos ocurre al mismo tiempo. Encontraron perfiles diferentes en la expresión de las enzimas intracelulares SOD2 (MnSOD), SOD1 (CuZnSOD) y la enzima extracelular SOD3 (CuZnSOD) ⁽¹⁹⁵⁾.

Aldehído deshidrogenasa (ALDH1A1) y CP

Las aldehídos deshidrogenasas (ALDH) son una familia de enzimas intracelulares que catalizan la oxidación de una variedad de aldehídos ⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾. Dos isoenzimas citosólicas, la clase 1A1 (ALDH1A1) y la clase 3A1 (ALDH3A1), tienen una tarea en resistencia a fármacos ⁽¹⁹⁹⁾. Varios estudios han determinado que la sobreexpresión de ALDH1A1 y ALDH3A1 en líneas celulares confiere resistencia in vitro a oxazafosforinas, incluyendo ciclofosfamida y sus metabolitos (Moreb y col., 1996; Sreerama y col., 1995). Se ha demostrado previamente que la expresión disminuida de ALDH1A1 por la utilización de ARN interferente e incrementa in vitro la sensibilidad de las células tumorales a la 4-hidroperoxiciclofosfamida, un metabolito activo de la ciclofosfamida ^(200, 201).

ALDH1A1 y ALDH3A1 son altamente expresadas en líneas celulares de NSCLC (202). Considerando las actividades metabólicas de estas enzimas, se ha hipotetizado que su sobreexpresión contribuye al fenotipo de resistencia a fármacos que usualmente caracteriza a los diferentes tipos de NSCLC. Además, estas enzimas participan en los procesos de detoxificación de los aldehídos carcinogénicos y están relacionadas con el hábito de fumar y el desarrollo de CP.

Patel y col. ⁽²⁰⁰⁷⁾ reportaron que los adenocarcinomas y los carcinomas escamocelulares de pulmón expresan altos niveles de ALDH1A1 y ALDH3A1, mientras que los SCLC expresan bajos niveles de estas enzimas, similar a los neumocitos normales ⁽²⁰³⁾.

Debido a la contribución de dichas enzimas a la resistencia a cisplatino ⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾, estos resultados podrían explicar por qué el cisplatino no es el fármaco de elección para el tratamiento de NSCLC, pero tiene buenos resultados en quimioterapia combinada en SCLC ⁽²⁰⁴⁾.

Ontología

Ontología GO: procesos biológicos

<http://www.geneontology.org/>

Dentro de los procesos biológicos enriquecidos identificados por GEO con significancia estadística ($p \leq 0,001$), fueron representativos los vinculados a los procesos de ciclo celular, reparación del ADN y procesos metabólicos, como se muestra en la **Tabla 2**:

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
cell cycle process	RT	14	3,4	1,1E-10	
cell cycle	RT	15	3,6	4,0E-10	
cell division	RT	10	2,4	1,3E-8	
cell cycle phase	RT	11	2,7	1,6E-8	
M phase	RT	10	2,4	3,4E-8	
mitotic cell cycle	RT	10	2,4	9,2E-8	
mitosis	RT	8	1,9	5,2E-7	
nuclear division	RT	8	1,9	5,2E-7	
M phase of mitotic cell cycle	RT	8	1,9	5,8E-7	
organelle fission	RT	8	1,9	6,8E-7	
DNA metabolic process	RT	9	2,2	1,3E-5	
cytoskeleton organization	RT	8	1,9	4,6E-5	
response to DNA damage stimulus	RT	7	1,7	1,7E-4	
DNA repair	RT	6	1,4	4,3E-4	
anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	RT	4	1,0	4,3E-4	
regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	RT	4	1,0	5,6E-4	
regulation of ubiquitin-protein ligase activity	RT	4	1,0	7,4E-4	
regulation of ligase activity	RT	4	1,0	8,2E-4	
phosphoinositide-mediated signaling	RT	4	1,0	1,0E-3	
regulation of protein ubiquitination	RT	4	1,0	1,5E-3	
cellular response to stress	RT	7	1,7	1,6E-3	
proteasomal protein catabolic process	RT	4	1,0	1,6E-3	
proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	RT	4	1,0	1,6E-3	
mitotic cell cycle checkpoint	RT	3	0,7	4,3E-3	
microtubule cytoskeleton organization	RT	4	1,0	4,5E-3	
spindle organization	RT	3	0,7	4,7E-3	
regulation of mitotic cell cycle	RT	4	1,0	5,0E-3	
intracellular signaling cascade	RT	9	2,2	6,1E-3	
regulation of cell cycle	RT	5	1,2	6,6E-3	
DNA replication	RT	4	1,0	9,2E-3	
response to abiotic stimulus	RT	5	1,2	9,5E-3	

Tabla 2. Procesos biológicos enriquecidos en el metasignatura con significancia estadística.

Ontología GO: componente celular

<http://www.geneontology.org/>

Los términos de la ontología GO: Cellular Component que resultaron enriquecidos, con significancia estadística, en la lista de genes propuesta son los siguientes:

Term	RT	Genes	Count	5	P-Value
cytoskeletal part	RT		12	2,9	2,4E-6
non-membrane-bounded organelle	RT		18	4,3	3,4E-6
intracellular non-membrane-bounded organelle	RT		18	4,3	3,4E-6
nucleoplasm	RT		11	2,7	9,7E-6
cytoskeleton	RT		13	3,1	1,4E-5
spindle	RT		6	1,4	1,5E-5
microtubule cytoskeleton	RT		9	2,2	1,6E-5
chromosome	RT		8	1,9	4,6E-5
chromosomal part	RT		7	1,7	1,6E-4
nuclear lumen	RT		11	2,7	6,5E-4
intracellular organelle lumen	RT		12	2,9	8,1E-4
organelle lumen	RT		12	2,9	9,8E-4
membrane-enclosed lumen	RT		12	2,9	1,2E-3
cytosol	RT		9	2,2	6,2E-3
condensed chromosome kinetochore	RT		3	0,7	7,1E-3
intermediate filament	RT		4	1,0	7,3E-3
intermediate filament cytoskeleton	RT		4	1,0	7,7E-3
condensed chromosome, centromeric region	RT		3	0,7	9,1E-3

Tabla 3. Componentes celulares enriquecidos en el metainformación con significancia estadística.

Ontología GO: función molecular

<http://www.geneontology.org/>

Los términos de la ontología GO: Función Molecular que resultaron enriquecidos, con significancia estadística, en la lista de genes propuesta son los siguientes:

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
chromatin binding	RT		4	1,0	3,6E-3
DNA insertion or deletion binding	RT		2	0,5	1,0E-2
MutL alpha complex binding	RT		2	0,5	1,2E-2
mismatch repair complex binding	RT		2	0,5	1,7E-2
double-stranded DNA binding	RT		3	0,7	1,7E-2
purine ribonucleotide binding	RT		9	2,2	2,9E-2
ribonucleotide binding	RT		9	2,2	2,9E-2
structure-specific DNA binding	RT		3	0,7	3,6E-2
purine nucleotide binding	RT		9	2,2	3,7E-2
mismatched DNA binding	RT		2	0,5	3,9E-2
structural molecule activity	RT		5	1,2	4,0E-2
protein complex binding	RT		3	0,7	6,2E-2
ATP binding	RT		7	1,7	7,9E-2
nucleotide binding	RT		9	2,2	8,1E-2
adenyl ribonucleotide binding	RT		7	1,7	8,3E-2
DNA binding	RT		9	2,2	9,6E-2

Tabla 4. Funciones moleculares enriquecidas en el metainformación con significancia estadística.

Conclusiones

El CP representa un grupo heterogéneo de enfermedades en términos de su biología y su curso clínico. El diagnóstico y clasificación de los tumores pulmonares se basa en la histología y los métodos inmunocitoquímicos, para diferenciar entre CP de célula pequeña (SCLC) y CP de célula no pequeña (NSCLC). La patogénesis molecular de CP incluye alteraciones genéticas y epigenéticas como la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (2-4). Estas alteraciones conllevan a un fenotipo maligno, resultando en cambios en la estructura celular, adhesión celular y proliferación.

Actualmente, son varios los esfuerzos dirigidos a identificar los posibles genes o grupos de genes alterados en el proceso de carcinogénesis pulmonar. Básicamente, se han buscado herramientas para su clasificación molecular y para entender mejor el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se obtenga una lista de genes que reflejen las alteraciones del CP en nuestra población, el siguiente paso será desarrollar técnicas para detectar estas alteraciones tanto en los tejidos tumorales como en otras muestras biológicas que puedan obtenerse en la rutina clínica y de modo mínimamente invasivo. La necesidad de desarrollar nuevas estrategias de detección y estrategias terapéuticas novedosas ha conducido a una búsqueda muy activa y productiva de alteraciones cromosómicas, genéticas, epigenéticas y fenotípicas asociadas al CP. En este sentido, los análisis bioinformáticos han aportado numerosos datos que demuestran abundantes cambios en los genes implicados en la patogénesis pulmonar. A pesar de la complejidad de los cambios genómicos observados en esta neoplasia, se han detectado algunos patrones comunes o más frecuentes.

Los estudios basados en microarreglos de ADN y ARN han ampliado el conocimiento de las diferencias en la biología de los tumores pulmonares, lo que ha permitido identificar nuevos genes candidatos con valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico. Se han publicado varios estudios de perfiles de expresión génica en CP, pero aún es difícil compararlos debido a las diferencias en las metodologías, plataformas de los arreglos, normalización de los datos y los enfoques de los análisis bioestadísticos, los cuales pueden influenciar la reproducibilidad y comparabilidad. Así, estas diferencias podrían conducir a resultados divergentes, con solapamiento limitado de los genes descritos.

El presente estudio generó una lista de 34 genes significativamente alterados en cáncer de pulmón que se encuentran involucrados en las vías de señalización de ciclo celular, reparación, metabolismo y proteínas de matriz extracelular. A este respecto, son varios los estudios que han hallado alteraciones asociadas a la patogénesis pulmonar, y estas alteraciones se han clasificado según el subtipo histológico. A continuación se muestran los genes identificados en el metassignature, teniendo en cuenta el subtipo histológico, los que actualmente se utilizan como marcadores pronóstico, y se muestra en qué otros tipos de cáncer se han identificado (**Tabla 5**).

Gen	Tipo histológico	Referencia	Otras asociaciones	Otros tipos de cáncer
Ciclo celular y reparación del ADN				
RAN	Carcinoma escamocelular, SCLC	Rohrbeck y col., 2008; Yan y col., 2010; Barrés y col., 2010	Puede ser utilizado como marcador de diagnóstico temprano	Pulmón, ovario
TOP2A	Adenocarcinoma	Rhodes y col., 2004; Sánchez-Suárez y Benítez-Bribiesca 2006; Landi y col., 2008; Ferte y col., 2010; Xu y col., 2010	Mortalidad asociado a hábito de fumar, resistencia a medicamentos, pobre pronóstico	Pulmón, ovario, vesícula, estómago, páncreas, colon, seno
WEE1	NSCLC	Yoshida y col., 2004	Marcador pronóstico	Pulmón
MVC	Carcinoma escamocelular, NSCLC	Kapoor y col., 2005; Rohrbeck y col., 2008	Asociado a metástasis	Pulmón
CCNB1	NSCLC	Volm 2000; Yoshida y col., 2004	Marcador pronóstico, la sobreexpresión relacionada con diferenciación e invasión vascular	Pulmón
MAD2L1	Carcinoma escamocelular, SCLC	Rohrbeck y col., 2008; Xu y col., 2010		Pulmón, tiroides, esófago, colon, páncreas, estómago
BUB1B	Carcinoma escamocelular, SCLC	Landi y col., 2008; Rohrbeck y col., 2008	Mortalidad asociado a hábito de fumar, asociado a estadios tempranos de cáncer de pulmón no fumadores	Pulmón, colon
EF3	Carcinoma escamocelular, NSCLC	Kapoor y col., 2005; Ken y col., 2008		Pulmón
PTTG1	Carcinoma escamocelular, SCLC	Gordon y col., 2006; Rohrbeck y col., 2008	Asociado con sobreexpresión y pobre pronóstico de cáncer de seno	Pulmón, cáncer de seno
CDK1	NSCLC	Eymin y Gazzeri, 2009	Blanco de tratamiento para los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas	Pulmón
CCNB2	SCLC	Mo y col., 2010	Marcador para monitorear metástasis y tratamientos terapéuticos	Pulmón
RAGGAP1	Carcinoma escamocelular, SCLC	Landi y col., 2008; Rohrbeck y col., 2008	Asociado a estadios tempranos en cáncer de pulmón no fumadores	Pulmón
CENPA	Carcinoma escamocelular, SCLC	Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
PRC1	Carcinoma escamocelular, SCLC	Landi y col., 2008; Rohrbeck y col., 2008; Xu y col., 2010	Asociado a estadios tempranos en cáncer de pulmón no fumadores, asociado a crecimiento tumoral	Pulmón, seno, páncreas, estómago
CCNA2	Carcinoma escamocelular, SCLC	Hosgood III y col., 2008; Landi y col., 2008; Rohrbeck y col., 2008; Kim y col., 2010	Asociado a estadios tempranos en cáncer de pulmón no fumadores, asociado a susceptibilidad a cáncer de pulmón	Pulmón
RFC4	Carcinoma escamocelular, SCLC	Rhodes y col., 2004; Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
MSH6	Carcinoma escamocelular, SCLC	Kariola y col., 2006; Rohrbeck y col., 2008		Pulmón, cáncer de colon, próstata, vesícula, endometrial, ovario
PGK1	Adenocarcinoma, NSCLC	Chen y col., 2003; Xi y col., 2005; Tang y col., 2008	Asociado a metástasis, importante blanco terapéutico para terapia farmacológica o génica	Pulmón
SFTPC	NSCLC	Yamamoto y col., 2005	Marcador en suero	Pulmón
PCNA	Carcinoma escamocelular, SCLC, NSCLC	Volm 2000; Rohrbeck y col., 2008	Factor de mal pronóstico	Pulmón
Matriz extracelular				
RABL2B	Adenocarcinoma, carcinoma escamocelular, SCLC	Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
KRT15	Adenocarcinoma	Xi y col., 2005; Edgerton y col., 2007; Rohrbeck y col., 2008	Asociado a metástasis	Pulmón
KRT7	Adenocarcinoma	Chen y col., 2003; Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
KRT8	Adenocarcinoma	Chen y col., 2003		Pulmón
KRT5	Adenocarcinoma, carcinoma escamocelular	Gordon y col., 2006; Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
TTF-1	Carcinoma escamocelular, SCLC, NSCLC	Gorton y col., 2006; Kalhor y col., 2006; Perner y col., 2008	Facilita la diferenciación patológica entre SCLC y carcinomas escamocelulares pobremente diferenciados	Pulmón
PLS3	Adenocarcinoma, carcinoma escamocelular	Rohrbeck y col., 2008		Pulmón
COL1A1	Adenocarcinoma, carcinoma escamocelular	Kobayashi y col., 1999; Xi y col., 2005; Lan Guo y col., 2006; Rohrbeck y col., 2008; Shintani y col., 2008; Xu y col., 2010	Asociado a metástasis, promueve la transición epitelio-mesénquimal en células de cáncer de pulmón, marcador tumoral en suero	Pulmón, seno, colon, páncreas

Tabla 5. Genes identificados en el metesignature, teniendo en cuenta el subtipo histológico, los que se utilizan como marcadores pronóstico y en qué otros tipos de cáncer se han identificado.

Referencias bibliográficas

- 1.Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin*; 55:74-108.
- 2.Spira A. et al. (2007). Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nat Med*; 13(3):361-6. Alizadeh A.A. et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*; 403:503-11.
- 3.Brambilla C. y Spiro S. (2001). Highlights in lung cancer. *Eur Respir J*; 18(4):617-8.
- 4.Khuder S.A., Mutgí A.B. y Nugent S. (2001). Smoking and breast cancer: a meta-analysis. *Environ Health*; 16(4):253-61.
- 5.Hirsch F.R., Merrick D.T. y Franklin W.A. (2002). Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention. *Eur Respir J*; 19(6):1151-8.
- 6.Perou C.M. et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; 17:406(6797):747-52.
- 7.Khan J. et al. (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med*; 7(6):673-9.
- 8.Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S. y Mesirov J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*; 102(43):15545-15550.
- 9.Anderson N.L. y Anderson N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*; 1(11):845-67.
- 10.Srivastava S., Verma M. y Henson D.E. (2001). Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res*; 7(5):1118-26.
- 11.Stoss, O. y Henkel, T. (2004). Biomedical marker molecules for cancer-current status and perspectives. *Drug Discovery Today: Targets* 3; 228-237.
- 12.Wagner P.D., Maruvada P. y Srivastava S. (2004). Molecular diagnostics: a new frontier in cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn*; 4(4):503-11.
- 13.Golub T.R. et al. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*; 286(5439):531-7.
- 14.Baumgartner C. et al. (2010). A new data mining approach for profiling and categorizing kinetic patterns of metabolic biomarkers after myocardial injury. *Bioinformatics*; 26:1745-1751.
- 15.West M., Ginsburg G.S., Huang A.T. y Nevins J.R. (2006). Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. *Genome Res*; 16(5):559-566.
- 16.Subramanian A. et al. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev*; 11:182-188.
- 17.Culhane A.C. et al. (2001). The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet*; 69:780-790.
- 18.Rhodes D.R. et al. (2007): Molecular concepts analysis links tumors, pathways, mechanisms, and drugs. *Neoplasia*; 9(5):443-454.
- 19.Singh A. et al. (2009). A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*; 15(6):489-500.
- 20.Datta S., Pihur V. y Datta, S (2010). An adaptive optimal ensemble classifier via bagging and rank aggregation with applications to high dimensional data. *BMC Bioinformatics*; 11:427.

Foto archivo Unimedios

[Ir al contenido...](#)

21. Saey Y., Inza I. y Larrañaga P. (2007). A review of feature selection techniques in bioinformatics. *Bioinformatics*; 23(19):2507-17.
22. Netzer M., et al. (2009). A new ensemble-based algorithm for identifying breath gas marker candidates in liver disease using ion molecule reaction mass spectrometry. *Bioinformatics*; 25(7):941-7.
23. Levine E. y Domany E. (2001). Resampling method for unsupervised estimation of cluster validity. *Neural Comput*; 13(11):2573-93.
24. Ringnér M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotechnol.*; 26(3):303-4.
25. Osl M. et al. (2008). A new rule-based algorithm for identifying metabolic markers in prostate cancer using tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*; 24(24):2908-14.
26. Ramoni M.F., Sebastiani P. y Kohane I.S. (2002). Cluster analysis of gene expression dynamics. *Proc Natl Acad Sci*; 99(14):9121-6.
27. Tusher V.G., Tibshirani R. y Chu G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci*; 98(9):5116-21.
28. Ransohoff D.F. (2003). Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*; 348(17):1715-7.
29. Feng Z., Prentice R. y Srivastava S. (2004). Research issues and strategies for genomic and proteomic biomarker discovery and validation: a statistical perspective. *Pharmacogenomics*; 5(6):709-19.
30. Ramaswamy S. et al. (2001). Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci*; 98(26):15149-54.
31. Brazma, A. et al (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet*; 29, 365-371.
32. Detours, V. et al. (2003). Integration and cross-validation of highthroughput gene expression data: comparing heterogeneous data sets. *FEBS Lett.*; 546, 98-102.
33. Desany B. (2004). Zhang *Bioinformatics and cancer target discovery. Drug Discov Today*; 9(18):795-802.
34. Takeuchi T. et al. (2006). Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol*; 24(11):1679-88.
35. Bittner M., et al. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*; 406(6795):536-40.
36. Vermeulen K., Van Bockstaele D.R. y Berneman Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*; 36: 131-49.
37. Molinari M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif*; 33: 261-274
38. Kondo T. et al. (2001). Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem*; 276: 17559-17567.
39. Sherr C.J. y Roberts J.M. (2007). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *FEBS Lett*; 581(2): 248-252.
40. Attwooll C., Denchi, E.L. y Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.*; 23, 4709-4716.
41. Yang A. y McKeon, F. (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 1:199-207.
42. Cartwright P. et al. (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*; 17:611-624.
43. Di Stefano L., Jensen M.R. y Helin K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.*; 22, 6289-6298.
44. Feber A. et al. (2004). Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene*; 23:1627-30.
45. Kaye F.J. (2002). RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene*; 21:6908-14.
46. Otterson G.A. et al. (1994). Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*; 9:3375-8.
47. Gouyer V. et al (1998). Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 18:188-96.
48. Shimizu E. et al. (1994) RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene*; 9:2441-2.
49. Beasley M.B. et al. (2003). The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol*; 34:136-42, 448.
50. Brambilla E. et al. (1996). Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol*; 149:1941-52.
51. Ullmann R. et al. (2002) The position of pulmonary carcinoids within the spectrum of neuroendocrine tumors of the lung and other tissues. *Genes Chromosomes Cancer*; 34:78-85.
52. Guggen M. et al. (2002). Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J Pathol*; 196:408-15.
53. Coe B.P. et al. (2006). Differential disruption of cell cycle pathways in small cell and non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*; 94(12):1927-35.
54. Cooper C.S. et al. (2006). Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer. *Lung Cancer*; 54(2):155-62.
55. De Antoni A. et al. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15(3):214-25.
56. Chen Y., Wang J. y Fraig M.M. et al (2001). Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer.

Cancer Res; 61:4112-4121.

57. Zhang S.H. et al. (2008). Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*; 39:1827-34.
58. van't Veer L.J. et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*; 415:530-6.
59. Garber M.E. et al. (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci*; 98:13784-9.
60. Sotillo R. et al. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*; 11:9-23.
61. van Deursen J.M. (2007). Rb loss causes cancer by driving mitosis mad. *Cancer Cell*; 11:1-3.
62. Li Y. y Benezra R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hSMAD2. *Science*; 274:246-8.
63. Nasmyth K. (2005). How do so few control so many? *Cell*; 120:739-46.
64. Garber P.M. y Rine J. (2002). Overlapping roles of the spindle assembly and DNA damage checkpoints in the cell-cycle response to altered chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*; 161: 521-34.
65. Mikhailov A., Cole R.W. y Rieder C.L. (2002). DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol*; 12:1797-806.
66. Fung M.K. et al. (2008). MAD2 interacts with DNA repair proteins and negatively regulates DNA damage repair. *J Mol Biol*; 381:24-34.
67. Dobles M. et al. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*; 101:635-45.
68. Michel L.S. et al (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*; 409:355-9.
69. Hernandez E. et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*; 430:797-802.
70. Hisaoka M., Matsuyama A. y Hashimoto H. (2008). Aberrant MAD2 expression in soft tissue sarcoma. *Pathol Int*; 58:329-33.
71. Jablonski, S. A. et al. (1998).. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma*; 107:386-396.
72. Cheeseman, I.M., Chappie J.S., Wilson-Kubalek E.M. y Desai A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*; 127:983-997.
73. Cheeseman I.M. y Desai A (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*; 9:33-46.
74. Boyarchuk Y., Salic A., Dasso M. y Arnaoutov A. (2007). Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *J. Cell Biol*; 176:919-928.
75. Huang H. et al (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol*; 177(3):413-24.
76. Kiyomitsu T., Obuse C. y Yanagida M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell*; 13:663-676.
77. Warren C.D. et al. (2002). Distinct chromosome segregation roles for spindle checkpoint proteins. *Mol Biol Cell*; 13(9):3029-41.
78. Chen, R. H. (2004). Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *EMBO J*; 23:3113-3121.
79. Mellone B., Erhardt S. y Karpen G.H. (2006). The ABCs of centromeres. *Nat Cell Biol*; 8(5):427-9.
80. Howman, E.V. et al. (2001). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 1148-1153.
81. Black, B. E. et al. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature*; 430:578-582.
82. Yoda, K. et al. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 97:7266-7271.
83. Margueron R. y Reinberg D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*; 469(7330):343-9.
84. Varambally S. et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*; 419(6907):624-9.
85. Kleer C.G. et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*; 100(20):11606-11.
86. Karanikolas B.D., Figueiredo M.L. y Wu L. et al. (2009). Polycomb group protein enhancer of zeste 2 is an oncogene that promotes the neoplastic transformation of a benign prostatic epithelial cell line. *Mol Cancer Res*; 7(9):1456-65.
87. Li X. et al. (2009). Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am J Pathol*; 175(3):1246-54.
88. Bracken A.P. et al. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*; 22(20):5323-35.
89. Ezhkova E. et al. (2009). Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell*; 136(6):1122-35.
90. Bracken A.P. et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev*; 21(5):525-30.

91. Kawamoto H., Koizumi H. y Uchikoshi T. (1997). Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant breast lesions. *Am. J. Pathol*; 150:15-23.
92. Murakami H., Furihata M., Ohtsui Y. y Ogoshi, S. (1999). Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*; 434:153-158.
93. Ohshima K. et al. (1999). Expression of cyclin E, A and B1 in Hodgkin and Reed-Stenberg cells: not suppressed by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression. *Pathol. Int.*; 49:506-512.
94. Banerjee S. K. et al. (2000). Expression of cdc2 and cyclin B1 in *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT and MALT lymphoma. *Am. J. Pathol*; 156:217-225.
95. Wang A. et al. (1997). Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*; 123:124-127.
96. Mashal R.D. et al. (1996). Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer Res*; 56:4159-4163.
97. Wolgemuth D.J. y Roberts S.S. (2010). Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: critical functions for cyclins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 365(1546):1653-62.
98. Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, Haddada H, Chiron M, Janicot M, Janot F, Tursz T, Vassal G. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. *Br J Cancer*. 2000;82(3):642-50.
99. Li JQ, Miki H, Wu F, Saoo K, Nishioka M, Ohmori M, Imaida K. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol*. 2002; 33(10):1006-15.
100. Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, Ko E, Kim Y, Kim S, Shim YM, Park J. A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. *Cancer*. 2011;117(17):4080-91.
101. Hosgood HD 3rd, Menashe I, Shen M, Yeager M, Yuenger J, Rajaraman P, He X, Chatterjee N, Caporaso NE, Zhu Y, Chanock SJ, Zheng T, Lan Q. Pathway-based evaluation of 380 candidate genes and lung cancer susceptibility suggests the importance of the cell cycle pathway. *Carcinogenesis*. 2008;29(10):1938-43.
102. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, Mao L. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res*. 2000 ;60(15):4000-4.
103. Dworakowska D, Gózdź S, Jassem E, Badzio A, Kobierska G, Urbaniak A, Skokowski J, Damps I, Jassem J. Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;35(1):35-41.
104. Dziadziszko R, Jassem E, Jassem J. Clinical implications of molecular abnormalities in lung cancer. *Cancer Treat Rev* 1998;24:317-30.
105. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:112-26.
106. Jassem E, Jassem J. Clinical relevance of genetic alterations in lung cancer. In: Mackiewicz A, Sehgal PB, editors. *Molecular Aspects of Cancer and its Therapy*. Basel: Birkhauser Verlag, 1998:45-57.
107. Gorgoulis VG, Zacharatos PV, Manolis E, Ikononopoulos JA, Damalas A, Lamprinoupolous C, Rassidakis GZ, Zoumpourlis V, Kotsinas A, Rassidakis AN, Halazonetis TD, Kittas C. Effects of p53 mutants derived from lung carcinomas on the p53-responsive element (p53RE) of the MDM2 gene. *Br J Cancer* 1998;77:374-84.
108. Fu XL, Zhu XZ, Shi DR, Xiu LZ, Wang LJ, Zhao S, Qian H, Lu HF, Xiang YB, Jiang GL. Study of prognostic predictors for NSCLC. *Lung Cancer* 1999;23:143-52.
109. Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Nakanishi R, Sugio K, Yasumoto K, Sugimachi K. p53 nuclear immunostaining and gene mutations in non-small cell lung cancer and their effect on patients survival. *Ann Oncol* 1995;6(suppl. 3):9-14.
110. Top B, Mooi WJ, Klaver SG, Boerrigter L, Wisman P, Elbers HR, Visser S, Rodenhuis S. Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1995;64:83-91.
111. Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila RI. 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;54:2496-503.
112. Esposito V, Baldi A, De Luca A, Micheli P, Mazzarella G, Baldi F, Caputi M, Giordano A. Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. *Hum Pathol* 1997;28:233-7.
113. Lavezzi AM, Santambrogio L, Bellaviti N, Biondo B, Nosotti M, Radice F, Matturri L. Prognostic significance of different biomarkers in NSCLC. *Oncol Rep* 1999;6:919-25.
114. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 1997; 1997(47):5-27.
115. Bellotti M, Elsner B, De Lima AP, et al. Neural networks as a prognostic tool for patients with non-small cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 1997; 10:1221-7.
116. Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB. Transcriptional activation of the human PCNA promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:895-9.
117. Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin M, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti CA. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992;70:1520-7.

- 118.**Oyama T, Mitsudomi T, Mizoue T, Ohgami A, Osaki T, Nakanishi R, Yasumoto K. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 1995;4:83-9.
- 119.**Theunissen PH, Leers MP, Bollen EC. PCNA expression in formalin-fixed tissue of NSCLC. *Histopathology* 1992;20:251-5.
- 120.**Fuji M, Motoi M, Saeki H, Aoe K, Moriwaki S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in nonsmall cell lung cancer. *Acta Med Okayama* 1993;47:103-8.
- 121.**Desforges JF. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1756-1761
- 122.**Morrow ChS, Cowan KH. Mechanisms of Antineoplastic Drug Resistance. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 4th Edition. Editado por VT DeVita , S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993: 340-348
- 123.**Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerasa IIalpha, Pglycoprotein and multidrug resistance protein (MRP) in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1998; 77): 1469-1473
- 124.**Plasencia C, Tarón M, Abad A. Genes de quimiorresistencia. *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Editado por R. Rosell, A. Abad. M. Monzó. A. Barnadas. Arán Ediciones S.A. Madrid 2000: 145-159
- 125.**Scagliotti GV, Novello S, Selvaggi G. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 1999; 10 (Suppl. 5): S83-S86
- 126.**Drake Fh, Hofmann GA, Bartus HF. Biochemical and Pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989; 28: 8154-8160
- 127.**Stewart CF, Ratain MJ. Topoisomerase Interactive Agents. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 6th Edition. Editado por VT DeVita , S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 2001: 415-431
- 128.**Rincon M, Broadwater G, Harris L, Crocker A, Weaver D, Dressler L, Berry D, Sutton L, Michaelson R, Messino M, Kirshner J, Fleming G, Winer E, Hudis C, Appel S, Norton L, Muss H; for the Cancer and Leukemia Group B. Interleukin-6, multidrug resistance protein-1 expression and response to paclitaxel in women with metastatic breast cancer: results of cancer and leukemia group B trial 159806. *Breast Cancer Res Treat*. 2006
- 129.**Faneyte IF, Kristel PM, van de Vijver MJ. Determining MDRI/P-glycoprotein expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2001; 93:114-22
- 130.**Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001 May; 32: 117-128
- 131.**Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432: 294-7.
- 132.**Quimby BB, Dasso M. The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:338-44.
- 133.**Gruss OJ, Vernos I. The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J Cell Biol* 2004;166:949-55.
- 134.**Koffa MD, Casanova CM, Santarella R, et al. HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation. *Curr Biol* 2006; 16:743-54.
- 135.**Joukov V, Groen AC, Prokhorova T, et al. The BRCA1/ BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* 2006; 127:539-52.
- 136.**Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997 ;11(4):433-41.
- 137.**Wu X, Hsu TC, Annegers JF, Amos CI, Fueger JJ, Spitz MR. A case-control study of nonrandom distribution of bleomycin-induced chromatid breaks in lymphocytes of lung cancer cases. *Cancer Res*. 1995 1;55(3):557-61.
- 138.**Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):19422-7.
- 139.**Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem*. 2001 16;276(11):8484-91.
- 140.**Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem*. 2000 24;275(47):36502-5.
- 141.**Wen CY, Nakayama T, Wang AP, Nakashima M, Ding YT, Ito M, Ishibashi H, Matsuo M, Shichijo K, Sekine I. Expression of pituitary tumor transforming gene in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;15:10(4):481-3.
- 142.**Cheng JQ, Ruggieri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3636-41.
- 143.**Crowell JA, Steele VE. AKT and the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway: important molecular targets for lung cancer prevention and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(4):252-3.
- 144.**Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene*. 2006; 25(1):130-8.
- 145.**Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 1990;348(6299):331-3.

146. Takahashi E, Hori T, O'Connell P, Leppert M, White R. Mapping of the MYC gene to band 8q24.12---q24.13 by R-banding and distal to fra(8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1991;57(2-3):109-11.
147. Soucek L, Whitfield J, Martins CP, Finch AJ, Murphy DJ, Sodik NM, Karnezis AN, Swigart LB, Nasi S, Evan GI. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature.* 2008; 455(7213):679-83.
148. Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH, Giangrande P, Wu L, Saavedra HI, Field SJ, Thompson MA, Yang H, Fujiwara Y, Greenberg ME, Orkin S, Smith C, Nevins JR. Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol Cell.* 2001;8(1):105-13.
149. Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell.* 2003;112(2):193-205.
150. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature.* 2007;448(7152):445-51.
151. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Lung pathology: the molecular genetics of non-small cell lung cancer. *Pathology.* 1995;27(4):295-301.
152. Chen, G., Wang, H., Gharib, T. G., Huang, C. C., Thomas, D. G., Shedden, K. A., Kuick, R., Taylor, J. M., Kardia, S. L., Misek, D. E., et al. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 2003; 2, 107–116.
153. Gharib, T. G., Chen, G., Wang, H., Huang, C. C., Prescott, M. S., Shedden, K., Misek, D. E., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Taylor, J. M., et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia* 2002; 4, 440–448.
154. Duan, Z., Lamendola, D. E., Yusuf, R. Z., Penson, R. T., Pfeffer, F. I. & Seiden, M. V. Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multidrug resistance phenotype. *Anticancer Res.* 2002; 22, 1933–1941.
155. Lay, A. J., Jiang, X. M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condron, R. & Hogg, P. J. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 2000; 408, 869–873
156. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD: Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003; 58:892-900.
157. Balsara BR, Testa JR: Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 2000; 21:6877-6883.
158. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD: A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2:327-43.
159. Risch A, Plass C: Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008; 123:1-7.
160. Baker SC, Bauer SR, Beyer RP, Brenton JD, Bromley B, Burrill J, et al.: The external RNA controls Consortium: a progress report. *Nature Methods* 2005; 2:731-734.
161. Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, Mills K, Schrappe M, Stanulla M, Wingen LU, van Dongen JJ, Schlegelberger B: Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia* 2006; 8:1385-92.
162. Rohrbeck A, Neukirchen J, Roskopf M, Pardillos GG, Gedder H, Schwalen A, Gabbert HE, von Haeseler A, Pitschke G, Schott M, Kronenwett R, Haas R, Rohr UP. Gene expression profiling for molecular distinction and characterization of laser captured primary lung cancers. *J Transl Med.* 2008; 7:6:69.
163. Jiricny J, Nystro m-Lahti M: Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Devel* 2000; 10:157-164.
164. Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, et al: Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79:1012-1017.
165. Yeh C-C, Lee C, Dahiya R: DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:409-413
166. Thykjaer T, Christensen M, Clark AB, et al: Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer. *Br J Cancer* 2001; 85:568-575.
167. Uchida N, Kumimoto H, Nishizawa K, et al: Mismatch repair and microsatellite instability in esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 91:687-691.
168. Hansen LT, Thykjaer T, Ørntoft TF, Rasmussen LJ, Keller P, Spang-Thomsen M, Edmonston TB, Schmutte C, Fishel R, Petersen LN. The role of mismatch repair in small-cell lung cancer cells. *Eur J Cancer.* 2003; 39(10):1456-67.
169. Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. Serum tumor markers. *Am Fam Physician.* 2003 15;68(6):1075-82
170. Buccheri G. Tumor markers: editorial meaning and use. In: Brambilla C, Brambilla E, editors. *Lung Tumors*, vol. 124, 1st. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999:435–52.
171. Sundstrom BE, Stigbrand TI. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers* 1994;9:102–8.
172. Buccheri G., Ferrigno D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer* 34 (2001) S65–S69
173. Johansson L. Histopathologic classification of lung cancer: Relevance of cytokeratin and TTF-1 immunophenotyping *Ann Diagn Pathol.* 2004; 8(5):259-67.
174. Di Loreto C, Di Lauro V, Puglisi F, Damante G, Favor D, Beltrami CA. Immunocytochemical expression of tissue specific transcription factor-1 in lung carcinoma. *J Clin Pathol* 1997; 50: 30-32.

175. Zhang L, Withsett J, Stripp B. Regulation of Clara cells secretory protein gene transcription by thyroid factor -1. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1350: 359-367.
176. Raab SS, Berg LC, Swanson PE, Wick MR. Adenocarcinoma in the lung in patients with breast cancer. Prospective analysis of the discriminatory value of immunohistology. *Am J Clin Pathol* 1993; 100:27-35.
177. Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: Comper WD. *Extracellular matrix*. Tokyo, Japan: Harwood Academic Publishers; 1996:22-67.
178. Jukkola A, Tahtela R, Tholix E, Vuorinen K, Blanco G, Risteli L, et al. Aggressive breast cancer leads to discrepant serum level of the type I procollagen propeptides PINP and PICP. *Cancer Res* 1997; 57:5517-20.
179. Kobayashi T, Gabazza EC, Taguchi O, Risteli J, Risteli L, Kobayashi H, Yasui H, Yuda H, Sakai T, Kaneda M, Adachi Y. Type I collagen metabolites as tumor markers in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 1999 1;85(9):1951-7
180. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 2003; 347:2141-2148. 2. Jobe AH, Ikegami M. Biology of surfactant. *Clin Perinatol* 2001; 28: 655-669
181. Curley AE, Halliday HL. The present status of exogenous surfactant for the newborn. *Early Human Development* 2001; 61: 67-83.
182. Noguee LM. Genetics of pediatric interstitial lung disease. *Curr Opin Pediatr* 2006;18:287-292.
183. Yamamoto O, Takahashi H, Hirasawa M, Chiba H, Shiratori M, Kuroki Y, Abe S Surfactant protein gene expressions for detection of lung carcinoma cells in peripheral blood. *Respir Med*. 2005;99(9):1164-74.
184. Makrilia, A. Kollias, L. Manolopoulos, K. Syrigos. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer *Cancer Invest*, 27 2009; 1023-1037
185. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery*. 2007;141:705-7.
186. Gogali A, Charalabopoulos K, Zampira I, Konstantinidis AK, Tachmazoglou F, Daskalopoulos G, et al. Soluble adhesion molecules E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin as lung cancer biomarkers. *Chest*. 2010;138: 1173-9.
187. Grothey A, Heistermann P, Philippou S, Voigtmann R. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer*. 1998;77:80 1-7.
188. Kamiyoshihara M, Kawashima O, Otani Y, Morishita Y. Clinical significance of the preoperative serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 in non-small cell lung cancer. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002;43:729-34.
189. Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kB. *Clin Cancer Res*. 2006;12: 7165-73.
190. Passlick B, Pantel K, Kuboschok B, Angstwurm M, Neher A, Thetter O, et al. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer*. 1996; 32A:141-5.
191. Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice. *Int J Mol Med*. 2001;7:13-19.
192. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, et al. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17:393-403.
193. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:957-965.
194. Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer AM, Richie JP Jr, Lazarus P, Muscat JE. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med*. 2009 1;46(1):20-4.
195. Liu G, Zhou W, Park S, Wang LI, Miller DP, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. The SOD2 Val/Val genotype enhances the risk of nonsmall cell lung carcinoma by p53 and XRCC1 polymorphisms. *Cancer*. 2004 15;101(12):2802-8.
196. Vasilioy V, Pappa A, Peterson DR. Role of aldehyde dehydrogenase endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 2000;129:1-19.
197. Sophos NA, Pappa A, Ziegler TL, Vasilioy V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem Biol Interact* 2001;130-132:323-37.
198. Sladek NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:7-23.
199. Von Eitzen U, Meier-Tuckman D, Agarwal DP, Goedde HW. Detoxification of cyclophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozymes. *Cancer Lett* 1994;76:45-9.
200. Moreb J, Schweder M, Suresh A, Zucali JR. Overexpression of the human aldehyde dehydrogenase class I results in increased resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Gene Ther* 1996;3:24-30.
201. Moreb JS, Muhoczy D, Ostmark B, Zucali JR. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:127-36
202. Sreerama L, Sladek NE. Class 1 and class 3 aldehyde

dehydrogenase levels in the human tumor cell lines currently used by the National Cancer Institute to screen for potentially useful antitumor agents. *Adv Exp Med Biol* 1997; 414:81-94.

203. Patel , Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D, Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer*. 2008;59(3):340-9.

204. Leighl NB, Goss GD, Lopez PG, Burkes RL, Dancey JE, Rahim YH, et al. Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin HCL (Caelyx) in combination with cyclophosphamide and vincristine as second-line treatment of patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 52:327-32



Foto archivo Unimedios

Anexos

Vías de señalización biológicas enriquecidas en el metasisignature

Los genes identificados en el metasisignature actúan en diferentes vías de señalización celular. A continuación se muestran los esquemas de las vías generados con el recurso bioinformático KEGG pathway.

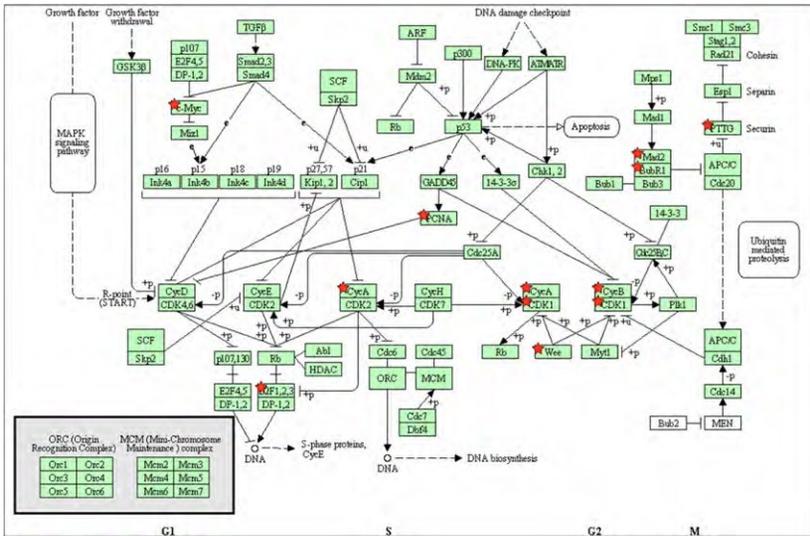


Figura 7. Ciclo celular. Genes del metasisignature involucrados en la vía de señalización de ciclo celular (estrellas rojas).

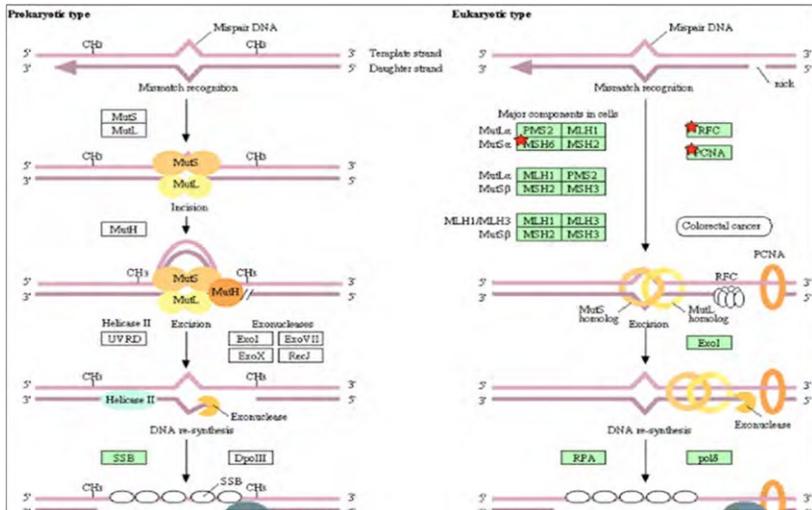


Figura 8. Genes del metagenoma involucrados en la vía de reparación del ADN (estrellas rojas).

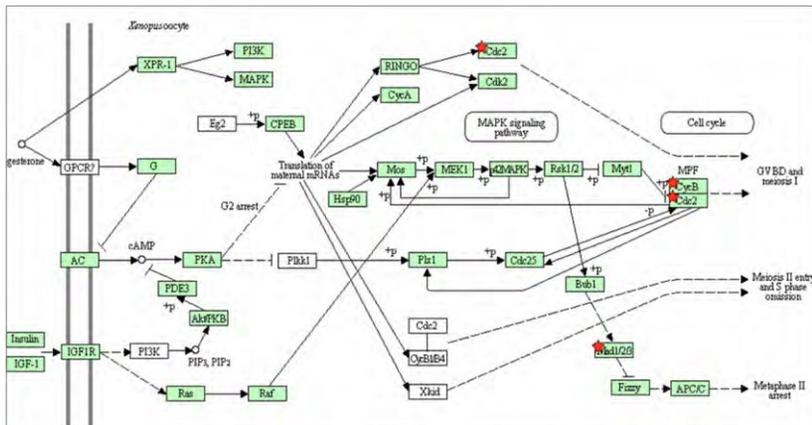


Figura 9. Genes del metagenoma involucrados en la vía de reparación del ADN (estrellas rojas).

Simbolo	Nombre del Gen	Función
COL1A1	Colágeno tipo I alpha	Adhesión focal, interacción con la matriz extracelular
KRT5	Keratin 5	Constituyente del citoesqueleto
RFC4	Replication factor C	Elongación del template de ADN
MAD2L1	Mitotic Arrest deficient 2	Impide la entrada de la anafase hasta que todos los cromosomas estén perfectamente alineados en la metafase
BUB1B	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	Quinasa control de la mitosis, requerida para la progresión normal de la mitosis, inhibe la actividad del complejo APC/C promotor de la anafase
RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	Estadios tempranos de embriogénesis y puede tener papel en los pasos dependientes de microtúbulos en citocinesis
PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1	Estabilidad de los cromosomas, reparación del ADN y la vía de p53/TP53
CCNB1	Cyclin B1	Control de ciclo celular fase G2/M
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Enzima glicolítica, cofactor de la polimerasa alfa
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Destruye radicales libres
NKX2-1 (TTF-1)	NK2 homeobox 1	Desarrollo de pulmón y homeostasis
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	Replicación del ADN
CYB5A	cytochrome b5 type A	Transportadora de electrones
KRT7	Keratin 7	Componente citoesqueleto, bloquea la interfase dependiente de interferón y estimula la síntesis de ADN en células
PLS3	Plastin 3	Proteína de unión a actina
KRT15	Keratin 15	Componente de citoesqueleto
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	Adhesión celular
RABL2B	RAB, member of RAS oncogene family-like 2B	Oncogén, regulación de la transcripción génica de genes relacionados con el crecimiento celular
CCNB2	Cyclin B2	Control del ciclo celular a nivel de la transición G2/M
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	Proteína de unión a microtúbulos
CENPA	Centromere protein	Variante de la Histona 3, en el nucleosoma de la cromatina centromérica. Requerida para el reclutamiento y ensamblaje de las proteínas del quinetocoro, marcador epigenético
CDK1 (CDC2)	Cyclin-dependent kinase 1	Reguladora ciclo celular, entrada en fase S y mitosis
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Proteína auxiliar de la DNA polimerasa involucrada en el control de replicación del ADN
MSH6	MutS homolog 6	Reparación del ADN
CCNA2	Cyclin A2	Esencial para el control del ciclo celular inicio de la fase G1/S y la transición a la fase G2/M
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	Oncogén, regulación de la transcripción génica de genes relacionados con el crecimiento celular
RAN	Member RAS oncogene family	Importe de proteínas al núcleo. Condensación de cromatina y control del ciclo celular
E2F3	E2F transcription factor 3	Factor de transcripción, regulación de la entrada en la fase S del ciclo celular
MSX2	Msh homeobox 2	Rol morfo -genético. En los osteoblastos, suprime la transcripción impulsada por el elemento de respuesta a la osteocalcina FGF (OCFRE) (267 bis)
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Convierte y oxida retinaldehído a ácido retinoico
WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	Regulador negativo de la entrada a mitosis transición G2/M
SFTPC	surfactant protein C	Promueve la estabilidad alveolar
SNRPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	Pre-RNA splicing
KRT8	Keratin 8	Componente del citoesqueleto, principalmente en células musculares

Tabla 6. Lista de los 34 genes identificados de los 40 estudios de expresión génica en cáncer de pulmón, con nombre oficial y la función.

