

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Análisis de la expresión génica relativa de las vías Notch, Wnt y Hedgehog en cancer stem cells en cáncer de pulmón no microcítico.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGIA

ALUMNO/A: Andrea Palomar Rios.

TUTOR UPV: Dra. Eloisa Jantus-Lewintre.

TUTOR INSTITUCIÓN: Dra. Silvia Calabuig-Fariñas.

Curso Académico:2014-2015

VALENCIA, Septiembre 2015

Tipo Licencia: Creative Common

Tabla de contenido

Índice de Tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	
1.1 CONCEPTO DE CÁNCER.....	1
1.2. CÁNCER DE PULMÓN.....	3
1.2.1. Epidemiología.....	3
1.2.2. Factores de Riesgo.....	4
1.2.3. Clasificación.....	6
1.2.4. Estadificación.....	10
1.2.5. Tratamiento.....	12
1.3. CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	15
1.3.1. Células Madre Tumorales en Cáncer de Pulmón.....	19
1.3.2. Principales vías de señalización implicadas en el mantenimiento y regulación de las CSCs.....	21
1.4. BIOMARCADORES EN CÁNCER.....	32
2. OBJETIVOS.....	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	
3.1. Cohorte de pacientes.....	35
3.2. Obtención de muestras y aislamiento de ARN.....	35
3.3. Cuantificación de ARN extraído.....	36
3.4. Transcripción Inversa.....	36
3.5. PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).....	37
3.6. Cuantificación relativa de la expresión génica.....	42
3.7. Análisis estadísticos.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	
4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COHORTE.....	46
4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	47
4.2.1. Cuantificación y valoración de la calidad del ARN.....	47
4.2.2. Cálculo de eficiencias y linealidad.....	47
4.2.3. Cuantificación relativa de la expresión génica.....	48
4.2.4. Análisis de correlaciones entre genes.....	52

4.2.5. Correlación entre los niveles de expresión génica con las variables clínico-patológicas.	60
4.2.6. Análisis del valor pronóstico del estudio de expresión de genes implicados en el mantenimiento y proliferación de CSC.	64
4.2.7. Análisis multivariante de Cox.	80
5. CONCLUSIONES	82
6. BIBLIOGRAFIA	84
7. ANEXOS.	93

Índice de Figuras.

Figura 1. Las 10 características distintivas del cáncer (Hanahan & Weinberg 2011).....	2
Figura 2. Representación de los tipos celulares que componen el microambiente tumoral.(Hanahan y Weinberg, 2011).	2
Figura 3. Incidencia por sexos de distintos tipos de cáncer en función del sexo desde 1975 a 2011. (Siegel et al. 2015).....	3
Figura 4. Evolución del riesgo asociado a ambos sexos (Fry et al. 2013).....	5
Figura 5. Contribución relativa a la incidencia del cáncer de diferentes factores de riesgo. (Sawyers et al. 2013).....	6
Figura 6. Clasificación del cáncer de pulmón en función del tipo histológico. Figura adaptada de Gridelli et al. 2015.	7
Figura 7. Mutaciones más frecuentes en CPNM según los dos tipos histológicos mayoritarios (adenocarcinoma y epidermoide). (Chan & Hughes 2015).....	7
Figura 8. Vías de señalización pro-oncogénica implicadas en cáncer de pulmón.(Alamgeer, Ganju & Watkins 2013)	9
Figura 9. Perfil mutacional en función del tipo histológico de cáncer de pulmón. (Gridelli et al. 2015).	9
Figura 10. Supervivencia global expresada en mediana de supervivencia y supervivencia a 5 años según el estadio patológico de la enfermedad.(Goldstraw et al. 2011).	12
Figura 11. Esquema de los fármacos y las dianas sobre las que actúan.	13
Figura 12. Implicación de las CSCs en las resistencias al tratamiento (Han et al. 2013).....	15
Figura 13. Esquema de los dos tipos de división posible que pueden sufrir las CSC.(McCaffrey & Macara 2011).	16
Figura 14. Modelos de desarrollo tumoral a partir de las CSC.....	17
Figura 15. Rutas de señalización implicadas en la regulación y el mantenimiento de las CSC.(Flaherty et al. 2012).	21
Figura 16. Efectos pleiotrópicos de la activación de la vía Notch. (Wilson & Radtke 2006).....	22
Figura 17. Proceso de translocación a la membrana plasmática A. y estructura B. de los receptores Notch 1-4.A.	23
Figura 18. Mecanismo de activación de la ruta de señalización Notch. (Yu et al. 2012)	24
Figura 19. Papel de β -catenina en la tumorigénesis. (Thakur et al, 2013).....	26

Figura 20. Ruta canónica de la vía Wnt, en condiciones de no sobreexpresión de WNT. (Stewart D, 2013)	27
Figura 21. Inhibidores de la ruta canónica de la vía Wnt.(Stewart D, 2013).	28
Figura 22. Ruta no canónica de la vía Wnt. La activación de la ruta no canónica se da por la expresión de Wnt5A.....	29
Figura 23. Activación de la ruta Hedgehog.(Yu et al. 2012)	31
Figura 24. Proceso de amplificación y emisión de señal mediante el uso de sondas TaqMan.(Koch 2004).....	38
Figura 25. Esquema básico de amplificación RT-qPCR. Adaptada de (Taron et al. 2004).....	39
Figura 26. Ejemplo de representación de la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen <i>ALDH1A1</i>	47
Figura 27. Mediana de expresión génica relativa de los genes estudiados.....	49
Figura 28. Esquema de la interrelación de las rutas canónica y no canónica de la vía Wnt.....	50
Figura 29. Representación esquemática de los genes analizados de la vía Notch y algunas de las correlaciones significativas obtenidas..	54
Figura 30. Representación esquemática de los genes analizados de la vía WNT y algunas de las correlaciones significativas obtenidas.	55
Figura 31. Representación esquemática de los genes analizados de la vía Hedgehog y algunas de las correlaciones significativas obtenidas..	57
Figura 32. Implicación de GSK3 β en las vías de señalización Notch, Wnt y Hedgehog.	58
Figura 33. Expresión génica según los tipos histológicos mayoritarios..	61
Figura 34. Curvas de Kaplan-Meier para el tamaño tumoral e infiltración linfática.....	65
Figura 35. Curvas Kaplan Meier para <i>HEY1</i>	67
Figura 36. Curva Kaplan Meier para la expresión combinada de <i>NOTCH1-HEY1</i> en la población general.....	68
Figura 37. Curvas Kaplan Meier para <i>MYC</i> en la población general.	69
Figura 38. Curva Kaplan Meier para <i>HEY1</i> en el subgrupo de pacientes con histología epidermoide.	72
Figura 39. Curva Kaplan Meier para <i>MYC</i> en el subgrupo de pacientes con histología epidermoide.	73
Figura 40. Curva Kaplan Meier para <i>CCND1</i> en histología epidermoide y en adenocarcinoma. 74	

Figura 41. Curva Kaplan Meier para <i>PTCH1</i> y <i>SMO</i> en el subgrupo de pacientes con histología adenocarcinoma.....	76
Figura 42. Curva Kaplan Meier para <i>HEY1</i> , <i>NOTCH1-HEY1</i> , <i>SMO</i> y <i>MYC</i> en la población fumadora.....	77
Figura 43. Curva Kaplan Meier para <i>MYC</i> en función del tratamiento de quimioterapia postoperatoria..	78
Figura 44. Curva Kaplan Meier para <i>CCND1</i> y <i>WNT5A</i> en función del tratamiento de quimioterapia postoperatoria.....	79
Figura 45. Curva Kaplan Meier para <i>MYC-CCND1</i> en la población que había recibido quimioterapia postoperatoria.....	80

Índice de Tablas.

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón según la 7ª edición del TNM. (Goldstraw et al. 2011)	11
Tabla 2. Marcadores de CSC para diferentes tipos de tumores sólidos.(Medema, 2013)	18
Tabla 3. Componentes de la Master Mix para la reacción de retrotranscripción por caso.....	37
Tabla 4. Programa de temperaturas para la transcripción inversa.....	37
Tabla 5. Sondas TaqMan Gene Expression Assay utilizadas en el estudio.....	40
Tabla 6. Componentes de la Master Mix para la amplificación RT-qPCR por caso.....	41
Tabla 7. Programa de temperaturas usado en la RT-qPCR	42
Tabla 8. Análisis descriptivo de la cohorte de pacientes	46
Tabla 9. Eficiencias de los genes analizados.....	48
Tabla 10. Genes analizados agrupados por rutas de señalización.....	48
Tabla 11. Correlaciones significativas observadas para los genes implicados en la vía de señalización Notch.	53
Tabla 12. Correlaciones significativas observadas entre los genes pertenecientes a la vía Notch y algunos de los marcadores característicos de un fenotipo CSC.....	54
Tabla 13. Correlaciones estadísticamente significativas entre los genes de la ruta Wnt ().....	55
Tabla 14. Correlaciones significativas entre los genes de la ruta Hedgehog.	56
Tabla 15. Correlaciones estadísticamente significativas entre los genes analizados como marcadores propios de CSC.	59
Tabla 16. Diferencias en la expresión génica relativa según las variables clínico-patológicas. ..	62
Tabla 17. Análisis univariante de supervivencia para las variables clínico-patológicas.....	64
Tabla 18. Análisis univariante de supervivencia (Kaplan-Meier) según los niveles de expresión génica de los genes estudiados.....	66
Tabla 19. Análisis de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Notch y marcadores de CSC.	70
Tabla 20. Análisis univariante de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Wnt.	72
Tabla 21. Análisis univariante de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Hedgehog.....	74

Tabla 22. Análisis multivariante de las características clínico-patológicas (Regresión de Cox).. 81

Tabla 23. Análisis multivariante de la expresión relativa de *MYC*, *HEY1* y *PTCH1* en diferentes poblaciones. 81

Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AKT: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*.

ALDH: Aldehído deshidrogenasa.

ALDH1A1: Aldehído deshidrogenasa 1, isoforma A1.

ALK: Quinasa linfoma anaplásico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Adenosina trifosfato.

bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos.

CPM: Cáncer de pulmón microcítico.

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico.

CSC: Célula madre tumoral (*Cancer stem cell*).

CSL: *CBF1 Supressor of hairless Lag-1*.

Ct: Ciclo umbral (Cycle Threshold).

CTC: Célula tumoral circulante (*Circulating tumor cell*).

CYP1A1: Citocromo P450 familia 1, subfamilia A, polipéptido 1.

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

ECOG-PS: *Performance Status* según ECOG.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ESC: Célula madre embrionaria (*Embryonary stem cell*).

FRET: Transferencia de energía por resonancia.

GSTM1: Glutation S-transferasa μ 1.

GSTT1: Glutation S-transferasa θ 1.

hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana.

IGF1-R: Receptor de factor de crecimiento insulínico de tipo 1.

LRP: *Lipoprotein related-receptor protein*.

NF-Kb: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NICD: Dominio intracelular de Notch.

PCR: *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PET: Tomografía de emisión de positrones.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.

PKC: Proteína quinasa C.

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

RT: Retrotranscripción.

SG: Supervivencia global.

SLR: Supervivencia libre de recaída.

SP: *Side population*.

T-ALL: Leucemia linfoblástica aguda de células T.

TC: Tomografía computarizada.

TCF: *T-cell factor* (factor de célula T)

TK: Tirosina quinasa.

TLR: Tiempo libre de recaída.

VEGF-A: Factor de crecimiento endotelial vascular A.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 CONCEPTO DE CÁNCER.

El término cáncer engloba a un gran número de patologías que tienen en común un crecimiento celular descontrolado y una diseminación no jerarquizada de células anormales. El proceso de la carcinogénesis implica cambios dinámicos en el genoma que llevan a la transformación de células, de manera que escapan a los mecanismos homeostáticos que controlan la proliferación y pierden la interacción normal con el microambiente que las rodea (Hanahan & Weinberg 2000). Este proceso se caracteriza por una elevada inestabilidad genómica así como por un crecimiento desordenado de las células neoplásicas en el tejido, que da lugar a la formación de una masa, conocida como tumor, que ha perdido la arquitectura tisular. Además, estas células pueden adquirir la capacidad de migrar a otros tejidos con el fin de establecerse en nuevos nichos y proliferar, dando lugar a la metástasis (Hanahan & Weinberg 2011).

La acumulación de mutaciones, debido a la inestabilidad genómica a la que están sometidas las células tumorales, supone una ventaja adaptativa para estas células y permite la adquisición de nuevas propiedades. En la actualidad, existe un consenso sobre las características distintivas que deben de presentarse en un tejido para que sea considerado tumoral. En el año 2000, Hanahan and Weinberg propusieron seis características esenciales para la transformación de un tejido normal a tumoral, conocidas como los “*hallmarks*” del cáncer: potencial replicativo ilimitado, independencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invasión o metástasis (Hanahan & Weinberg 2000). Algunos años más tarde, los mismos autores propusieron cuatro nuevas propiedades: la inestabilidad genómica, la alteración del metabolismo energético, capacidad pro-inflamatoria y evasión del sistema inmunitario (Figura 1)(Hanahan & Weinberg 2011).

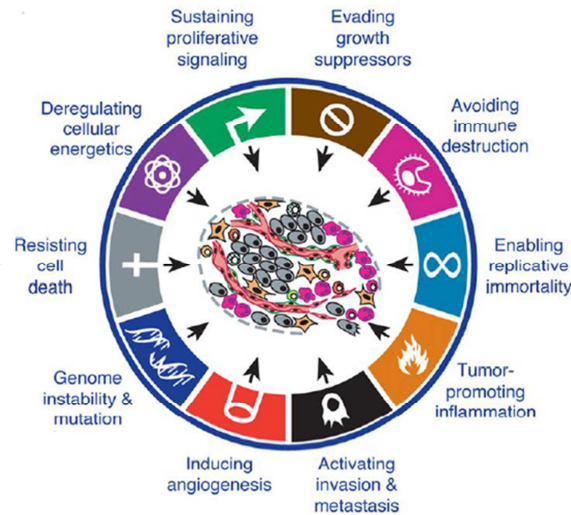


Figura 1. Las 10 características distintivas del cáncer (Hanahan & Weinberg 2011).

Es importante tener en cuenta que los tumores, aparte de las células cancerosas, se componen también de otros tipos celulares que contribuyen a la adquisición de las características distintivas que se mencionaron anteriormente y que forman parte de lo que se conoce como “microambiente tumoral” (Figura 2). Este microentorno presenta distintos tipos celulares, como por ejemplo células del sistema inmune, células madre tumorales (CSC), pericitos, células endoteliales, fibroblastos asociados a cáncer, entre otros, que favorecen el crecimiento y progresión del tumor (Hanahan & Weinberg 2011).

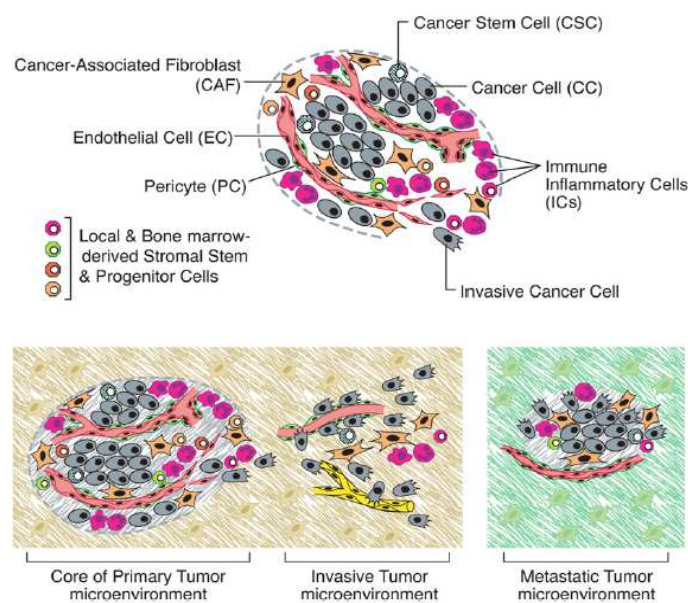


Figura 2. Representación de los tipos celulares que componen el microambiente tumoral. (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2. CÁNCER DE PULMÓN.

1.2.1. Epidemiología.

Actualmente el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Respecto a la incidencia, cada año se diagnostican más de 1,5 millones de casos en todo el mundo, con una mortalidad de 1,4 millones (Ferlay et al. 2015; Lortet-tieulent et al. 2014). Con estas cifras de incidencia y mortalidad, que se han elevado durante el último siglo debido en parte al aumento del hábito tabáquico, actualmente el cáncer de pulmón ha pasado a considerarse una epidemia (Groot & Munden 2012). Epidemiológicamente existen diferencias a nivel de sexo, raza y nivel socioeconómico (Siegel et al. 2015). El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en hombres, por detrás del de próstata y el tercero más diagnosticado en mujeres, por detrás del de mama y colrecto (Figura 3). No obstante, mientras la incidencia del cáncer de pulmón en mujeres en Estados Unidos y Europa se ha incrementado desde la década de los 70 debido al aumento de consumo de tabaco, relacionado con los cambios sociales y económicos de la época; la incidencia de cáncer de pulmón en varones ha empezado a disminuir debido en parte, a las campañas de deshabituación que se han puesto en marcha en algunos países (Figura 3) (Lortet-tieulent et al. 2014).

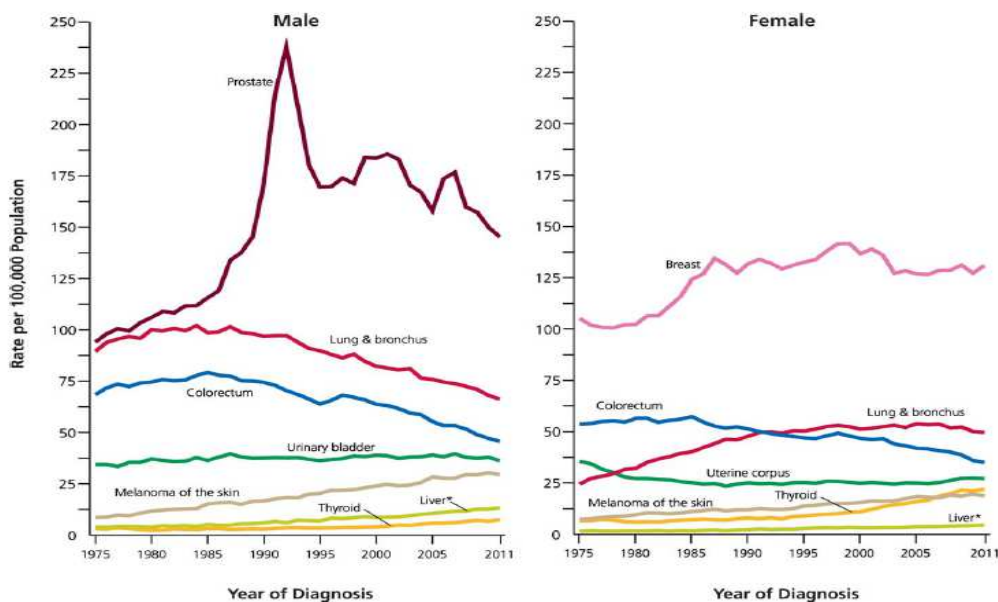


Figura 3. Incidencia por sexos de distintos tipos de cáncer en función del sexo desde 1975 a 2011. (Siegel et al. 2015).

Cabe destacar que a pesar de todos los avances en investigación biomédica y a las mejoras en las tecnologías diagnósticas y terapéuticas que se ha realizado en las últimas décadas, el cáncer de pulmón sigue teniendo una supervivencia a 5 años de aproximadamente el 15% (Malvezzi et al. 2014; Lortet-tieulent et al. 2014; Bosetti et al. 2013; Groot & Munden 2012). Esto es debido, en gran parte, a que la mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados, donde la cirugía con intención curativa no es una opción válida para estos pacientes.

1.2.2. Factores de Riesgo.

La capacidad de las células para malignizarse y adquirir las propiedades distintivas del cáncer descritas por Hanahan y Wienberg se deben básicamente a la inestabilidad del genoma de las células tumorales y específicamente a fallos en los mecanismos de reparación del ADN. Estos procesos están influenciados tanto por factores genéticos, factores ambientales como por el estilo de vida (Figura 5).

Existen casos de susceptibilidad genética heredada a desarrollar cáncer. Éstos se conocen como síndromes de cáncer familiar, caracterizándose por una incidencia mucho mayor de padecer distintos tipos de tumores. Se deben, en gran medida, a mutaciones en la línea germinal que afectan principalmente a genes supresores de tumores como *p53* o *retinoblastoma* (Groot & Munden 2012).

Sin embargo, en el cáncer de pulmón, el hábito tabáquico es, sin lugar a dudas, el principal factor causal de esta patología (Groot & Munden 2012). El humo del tabaco contiene unas 4000 sustancias químicas, 60 de las cuales se consideran carcinógenas. Entre estas sustancias se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, N-nitrosaminas y aminas aromáticas. Estos metabolitos son responsables del daño al ADN, por lo que son compuestos relacionados tanto con el origen como con la promoción del desarrollo de los tumores (Groot & Munden, 2012; Sasco, Secretan, & Straif, 2004; Khuder & Mutgi, 2001).

Varios estudios ponen de manifiesto el mayor riesgo de los fumadores a padecer cáncer de pulmón. En función del grado de consumo de tabaco, los fumadores presentan entre 15% y 30% veces más probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón (Khuder & Mutgi 2001). En estudios realizados en Europa, Asia y Norteamérica se señala al tabaquismo como el

responsable del 91% de los casos de cáncer de pulmón en varones y del 69% en mujeres (Freedman 2008; Gandini et al. 2008; Khuder & Mutgi 2001; Sasco et al. 2004).

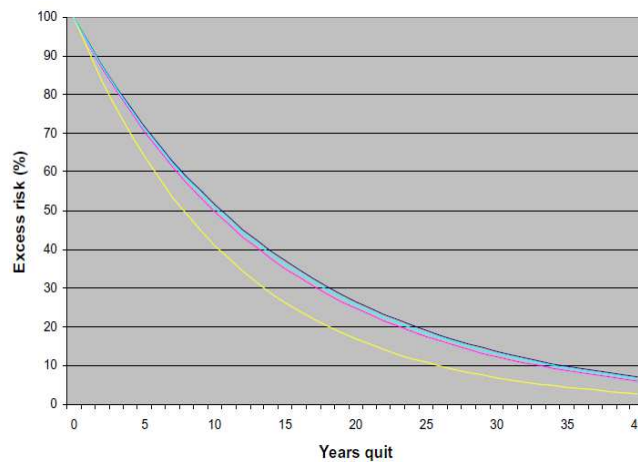


Figura 4. Evolución del riesgo asociado a ambos sexos (Fry et al. 2013). La serie rosa hace referencia a la población global, la serie azul oscuro a la población masculina, la serie amarilla engloba a la población femenina y la serie azul claro engloba conjuntamente a la población masculina y femenina.

No obstante, la relación del consumo de tabaco y el riesgo de padecer cáncer de pulmón es directamente proporcional a la dosis, por lo que un cese del hábito tabáquico lleva asociada una disminución del riesgo para todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón (Fry et al. 2013). Asimismo, la reducción del riesgo aumenta proporcionalmente al número de años de abstinencia. La reducción progresiva en la incidencia de cáncer de pulmón se continúa manifestando durante más de 10 años después del cese del hábito tabáquico. A pesar de la disminución del riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en ex-fumadores, el riesgo nunca llega a igualarse con el riesgo asociado a no fumadores (Khuder & Mutgi 2001). En mujeres parece observarse un mayor, y más rápido, descenso del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón después del cese del hábito tabáquico (Figura 4)

A pesar de que el 90% de casos de cáncer de pulmón se asocian con el tabaquismo, solamente el 15-30% de fumadores desarrolla este tipo de neoplasias, sugiriendo la influencia de otros factores en la susceptibilidad de los individuos a los carcinógenos pulmonares. Se han identificado tanto modificaciones epigenéticas en el ADN como mutaciones en alelos de algunos genes, asociados a la mayor susceptibilidad del cáncer de pulmón, codificantes para proteínas relacionadas con el metabolismo de los carcinógenos del tabaco como *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* (Khuder & Mutgi 2001).

Además del tabaquismo, otros factores ambientales (Figura 5) como la exposición involuntaria al humo del tabaco como otros contaminantes ambientales como el radón se asocian a un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón. Por otra parte una dieta rica en grasas saturadas, bebidas alcohólicas y aminos heterocíclicas tienen un efecto pro-tumorigénico mientras que una dieta rica en antioxidantes y vitaminas tienen un efecto protector (Sawyers et al. 2013).

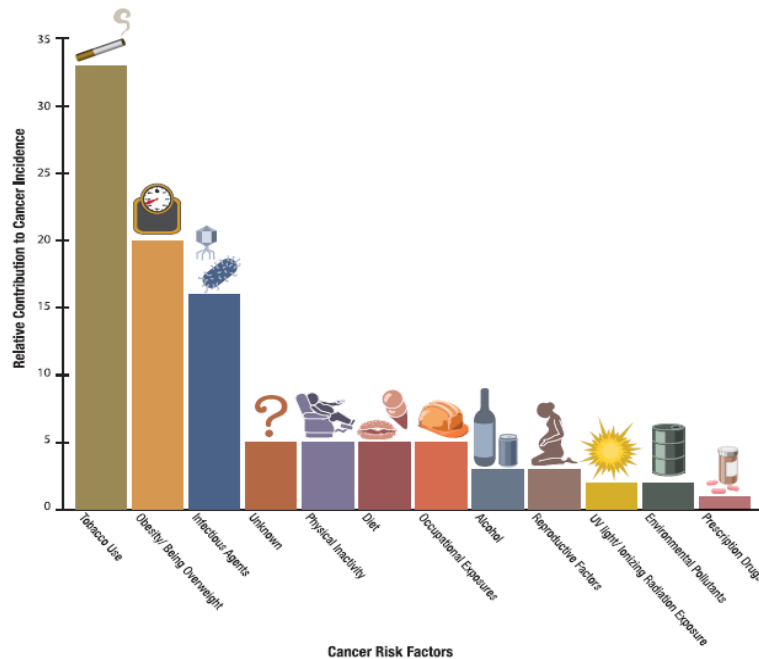


Figura 5. Contribución relativa a la incidencia del cáncer de diferentes factores de riesgo. (Sawyers et al. 2013)

1.2.3. Clasificación.

La clasificación clásica del cáncer de pulmón se basa tanto en el tipo histológico como en manifestaciones clínicas. Existen cuatro tipos histológicos distintos de cáncer de pulmón: el carcinoma microcítico de pulmón o de célula pequeña (CMP) (20% de los casos), el carcinoma epidermoide (30%), el adenocarcinoma (35-40%) y el carcinoma de células grandes (alrededor de un 10%). Desde el punto de vista clínico, sin embargo, se reconocen básicamente dos tipos fundamentales en función de su comportamiento clínico y biológico: el carcinoma microcítico de pulmón, sensible a los agentes citotóxicos y no tratable quirúrgicamente; y el cáncer de pulmón no microcítico o de célula no pequeña (CPNM), que engloba a los otros tres subgrupos histológicos (Gridelli et al. 2015).

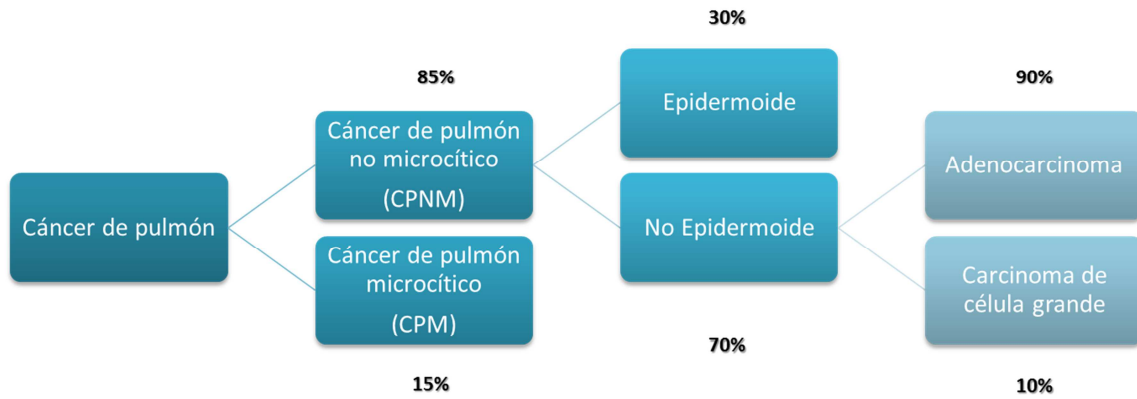


Figura 6. Clasificación del cáncer de pulmón en función del tipo histológico. Figura adaptada de Gridelli et al. 2015.

Con el auge de la biología molecular y con el desarrollo de nuevas tecnologías como la RT-PCR, pirosecuenciación, *microarrays*, secuenciación de nueva generación (NGS) se han podido realizar estudios más detallados de las alteraciones moleculares presentes en los diferentes tipos de cáncer de pulmón lo que ha permitido una renovación completa de la clasificación de la enfermedad, abriendo el camino hacia una clasificación molecular de los carcinomas pulmonares. Además, los avances en el conocimiento de las bases moleculares del CPNM han liderado una revolución en el tratamiento personalizado de esta patología (Hirsch et al., 2010; Ladanyi, 2008; Pao and Girard, 2011) (Figura 7).

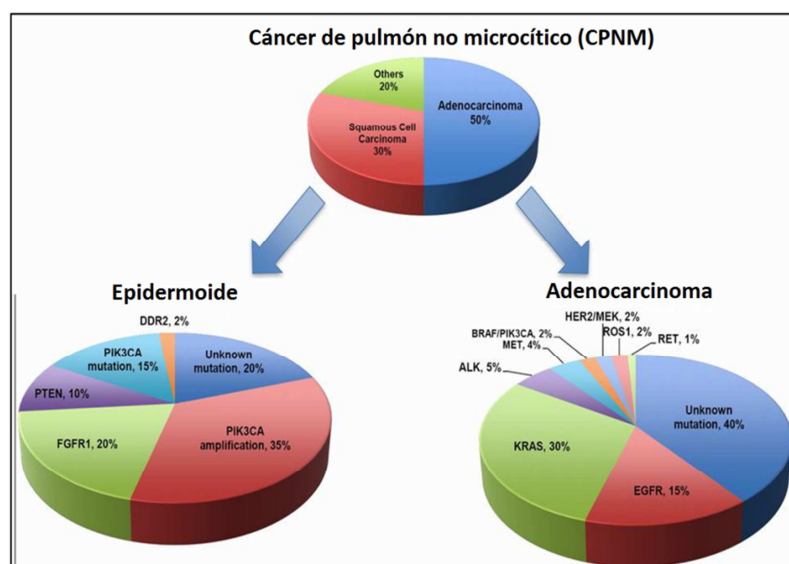


Figura 7. Mutaciones más frecuentes en CPNM según los dos tipos histológicos mayoritarios (adenocarcinoma y epidermoide). (Chan & Hughes 2015).

La primera de las evidencias sobre alteraciones presentes en adenocarcinomas fue publicada en 2004, cuando se describieron las alteraciones presentes en el gen **EGFR**. En CPNM la frecuencia de mutaciones en EGFR es del 6-10%, viéndose aumentada si se seleccionan los casos de adenocarcinoma (5-15%) (Pao et al. 2011). Los dos tipos de mutaciones más frecuentes, que se correlacionan con una sensibilidad a los inhibidores de tirosina-quinasa (TKI), son una mutación “*missense*” que lleva a un cambio aminoacídico y una mutación a nivel del dominio tirosina-quinasa intracelular (Hirsch et al. 2003). Otro tipo de mutaciones menos comunes producen resistencia a estos agentes (Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004).

KRAS es un proto-oncogen, perteneciente a la familia de proteínas RAS, es un componente principal en la transducción de la señal “downstream” inducida por factores de crecimiento como **EGFR**. En el 25%-40% de los casos se encuentran mutaciones que activan a **KRAS** en adenocarcinomas de pulmón y que se asocian con un peor pronóstico (Figura 7) (Karnoub & Weinberg 2008; Downward 2003). Actualmente no existe posibilidad de tratamiento con anticuerpo anti-EGFR para aquellos pacientes que presentan mutaciones en **KRAS** (Camps et al. 2011). Cabe destacar que mutaciones a nivel de **EGFR** y **KRAS** en CPNM son mutuamente excluyentes. Además de mutaciones en **KRAS**, se han descrito mutaciones en otros genes pertenecientes a la familia RAS como **NRAS** aunque son menos frecuentes (Figura 8).

Se han identificado también reordenaciones en el gen **ALK** (quinasa de linfoma anaplásico) que dan como resultado fusiones **ALK-EML4** (proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4) que desemboca en una activación constitutiva de la quinasa (Koivunen et al. 2008; Soda et al. 2007). Se encuentra esta fusión génica en CPNM en los siguientes subgrupos: pacientes jóvenes, que nunca fumaron o con tumores del tipo adenocarcinoma (Horn & Pao 2009) (Figura 8). La fusión del gen **ALK** es una alteración observada en CPNM en lo que no se encuentran alteraciones en los genes **KRAS**, **EGFR** y **ROS1** (Peters et al. 2013). Los tumores que presentan estos reordenamientos en **ALK** responden de manera efectiva a la terapia con Crizotinib (Crino et al. 2011).

Alteraciones en **BRAF** se encuentran en muy pocos casos de CPNM (alrededor del 1%) y son más frecuentes en adenocarcinomas. **BRAF** es el puente de unión entre la familia de RAS GTPasas y la familia de las MAPK quinazas, que controlan los procesos de proliferación (Pao et al. 2011).

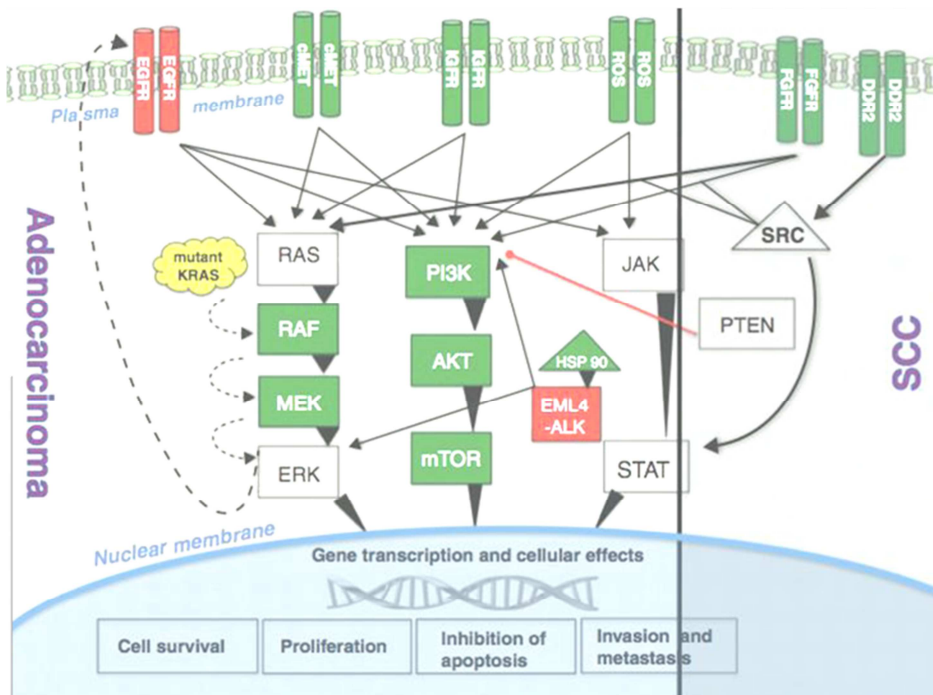


Figura 8. Vías de señalización pro-oncogénica implicadas en cáncer de pulmón.(Alamgeer, Ganju & Watkins 2013)

Como se observa en la Figura 9, y como se ha adelantado anteriormente, las alteraciones en *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *ALK* o *BRAF* son más características de adenocarcinoma mientras que los tumores escamosos se caracterizan por presentar alteraciones en *PTEN*, *PIK3CA* o *FGFR1*.

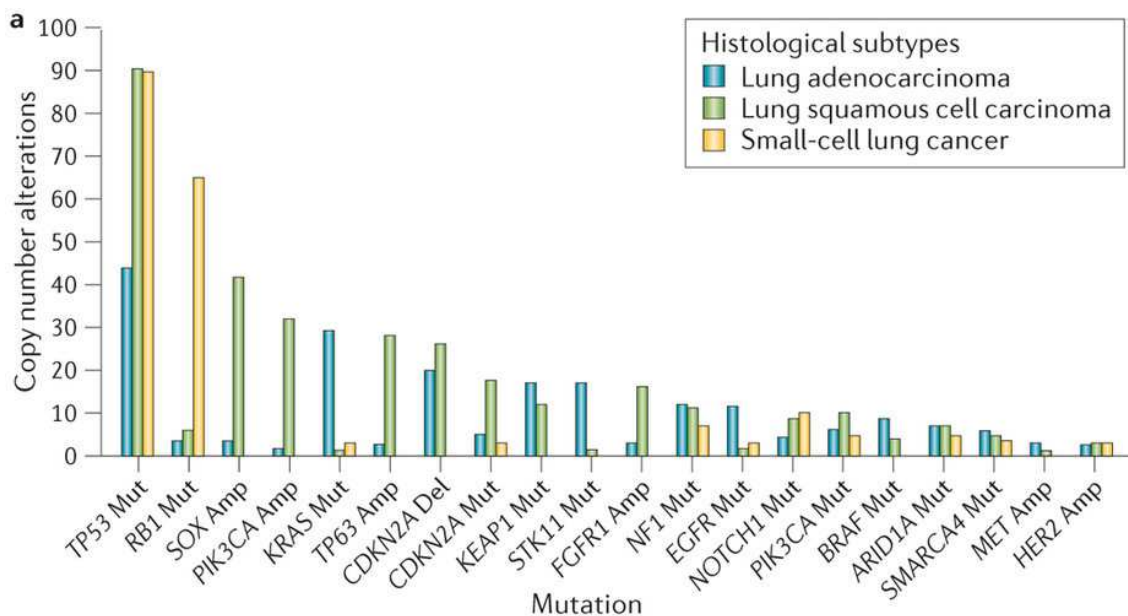


Figura 9. Perfil mutacional en función del tipo histológico de cáncer de pulmón. (Gridelli et al. 2015).

Los hallazgos en la biología molecular del tumor, junto con la identificación de todas estas alteraciones en genes “driver”, que conducen a una señalización pro-oncogénica (Figura 8), han proporcionado nuevos tratamientos dirigidos con el consiguiente beneficio a nivel de calidad y esperanza de vida para el paciente. Sin embargo, los casos con mutaciones desconocidas sobretodo en adenocarcinomas aún siguen siendo bastante importantes (40%) Figura 9 y son necesarios nuevos estudios que nos ayuden a mejorar el tratamiento de estos pacientes.

1.2.4. Estadificación.

El diagnóstico del cáncer de pulmón se inicia ante la aparición de síntomas tales como tos persistente, dolor torácico, hemoptisis, disnea o pérdida de peso. En un gran porcentaje de pacientes (70-75%), este diagnóstico ocurre en fases avanzadas de la enfermedad, cuando ya no es posible la intervención curativa (cirugía). Las técnicas diagnósticas pretenden, en primer lugar, determinar la localización del tumor primario y su posterior estudio mediante anamnesis y exploración física del paciente, técnicas de imagen, como placa de tórax, TC, resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones (PET), y test de funcionalidad pulmonar ayudan a completar el estudio y valorar el grado de extensión de la enfermedad. La confirmación histológica es un paso esencial en el diagnóstico, y requiere de tejido para su realización., Técnicas como la broncoscopia, la endoscopia por ultrasonido (EUS) o el ultrasonido endobronquial (EBUS) están disponibles para conseguir biopsiar el tumor (Jantus-Lewintre et al. 2012).

Todos estos estudios nos ayudarán a determinar el estadio del cáncer de pulmón en función de su extensión anatómica (estadificación), basado en la Clasificación de Tumores Malignos que utiliza básicamente tres parámetros: el tamaño tumoral, la infiltración de los nódulos linfáticos y la presencia o no de metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis –TNM) creada en 1977 por el AJCC y la UICC y actualizada en 2010 (Goldstraw 2011).

La clasificación vigente actualmente se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón según la 7ª edición del TNM. (Goldstraw et al. 2011).

Estadios	T	N	M
Oculto	T _x	N0	M0
0	T _{is}	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a,b	N2	M0
	T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

T_x: El tumor primario no puede ser evaluado. T₀: no hay evidencias de tumor primario. T_{is}: carcinoma in situ. T1a: tumor primario < 2 cm. T1b: tumor primario entre 2 y 3 cm (b). T2a: tumor primario entre 3 cm y 5 cm. T2b: tumor primario entre 5 cm y 7 cm. T3: tumor primario > 7 cm y que pueda invadir tejidos adyacentes como el diafragma, el nervio frénico, pleura mediastinal, pericardio lateral o tumoración en bronquio principal sin invadir la carina. Puede haber crecido hacia el interior de las vías respiratorias hasta causar un colapso total o neumonía en un pulmón. Dos o más nódulos tumorales en un mismo lóbulo pulmonar. T4: tumor de cualquier tamaño con las siguientes características: (a) que haya crecido hacia el mediastino, corazón, grandes vasos cercanos al corazón, la tráquea, el esófago o la carina. (b) Presencia de más de dos nódulos separados en ambos lóbulos. N hace referencia a los ganglios linfáticos afectados. N_x: no se puede evaluar la afectación linfática. N0: no hay ganglios linfáticos adyacentes afectados. N1: propagación a los ganglios linfáticos hiliares localizados en el mismo lado que el tumor primario. N2: ganglios localizados en la carina o mediastino afectados. N3: propagación del cáncer a ganglios supraclaviculares y/o ganglios linfáticos hiliares o mediastinales opuestos al lado del tumor primario. M hace referencia a la metástasis distal. M0: no hay órganos ni tejidos distales afectados. M1a: se detecta metástasis en el otro pulmón o en pericardio. M2b: afectación de ganglios linfáticos distales o propagación a otros órganos como el hígado o el cerebro.

La estadificación es de vital importancia para valorar diferentes opciones de tratamiento, así como para conocer el pronóstico de la enfermedad (Figura 10).

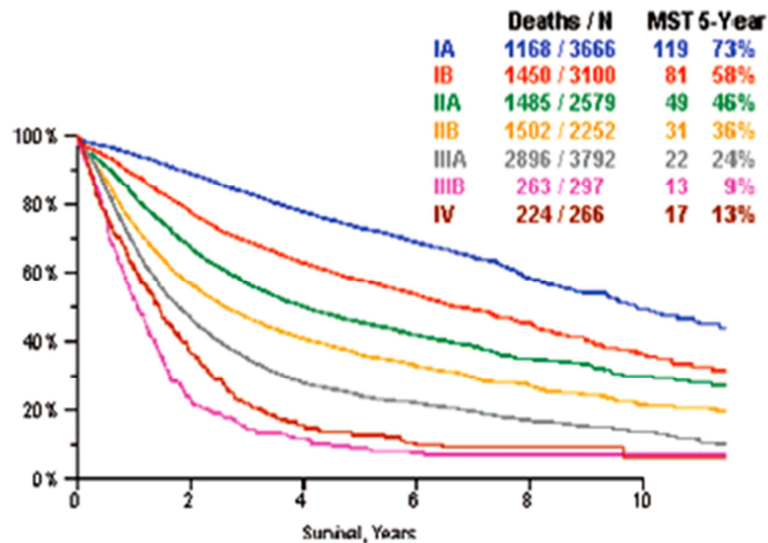


Figura 10. Supervivencia global expresada en mediana de supervivencia y supervivencia a 5 años según el estadio patológico de la enfermedad.(Goldstraw et al. 2011).

A pesar de que el TNM es una herramienta útil, no es suficiente para predecir el pronóstico en ciertos grupos de pacientes, ya que en un mismo estadio se pueden estar incluyendo una gran heterogeneidad de tumores, con diferente comportamiento biológico, por lo que es necesario ahondar en la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una clasificación más precisa.

1.2.5. Tratamiento.

El tratamiento en CPNM depende de varios factores como el estado funcional del paciente (*Performance status*), el tipo histológico, la funcionalidad pulmonar, y las distintas alteraciones moleculares presentes en las células tumorales. Pero, tal y como señalamos anteriormente, el principal determinante para la selección del tratamiento es el estadio de la enfermedad, pues en función del mismo el objetivo del tratamiento será distinto.

La cirugía, cuya intención es realizar un tratamiento curativo de la enfermedad, se recomienda sobretodo en estadios tempranos (I-III A), en los que el tumor se encuentra localizado y no hay diseminación. En estos pacientes sometidos a resección quirúrgica (lobectomía o neumonectomía) se consigue que entre el 40 y el 70% queden libres de enfermedad(Myrdal et al. 2001).

En pacientes en estadios avanzados (IIIB-IV) el CPNM se considera una enfermedad incurable, y el objetivo en este caso será prolongarla supervivencia del paciente, paliando los síntomas de la enfermedad en la medida de lo posible. En estos casos, la quimioterapia o la radioterapia son los tratamientos de elección. La quimioterapia paliativa basada en regímenes combinados platinos con paclitaxel, docetaxel, gemcitabina o vinorelbina es la opción más estandarizada para este tipo de pacientes. Las tasas de respuesta al tratamiento son pobres (entre el 30% - 40%) traduciéndose en una mediana de supervivencia global de entre 8 y 10 meses (Gadgeel *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2008).

No obstante, con el conocimiento actual acerca de la biología molecular del CPNM, se han podido identificar mutaciones en genes *driver* como *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* o *KRAS* que los han convertido en nuevas dianas terapéuticas. Fármacos dirigidos contra alteraciones en estos genes diana (Figura 11) tales como Gefitinib o Erlotinib (inhibidores de la actividad quinasa de EGFR) *EGFR-TK*, Crizotinib (inhibidor de la actividad quinasa en genes traslocados como *ALK* o *ROS1*) o Bevacizumab (anticuerpo monoclonal recombinante humanizado del factor de crecimiento vascular-endotelial, VEGF, han sido una revolución en el tratamiento de estos tumores, aportando un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes con estadios avanzados portadores de algunas de estas alteraciones.

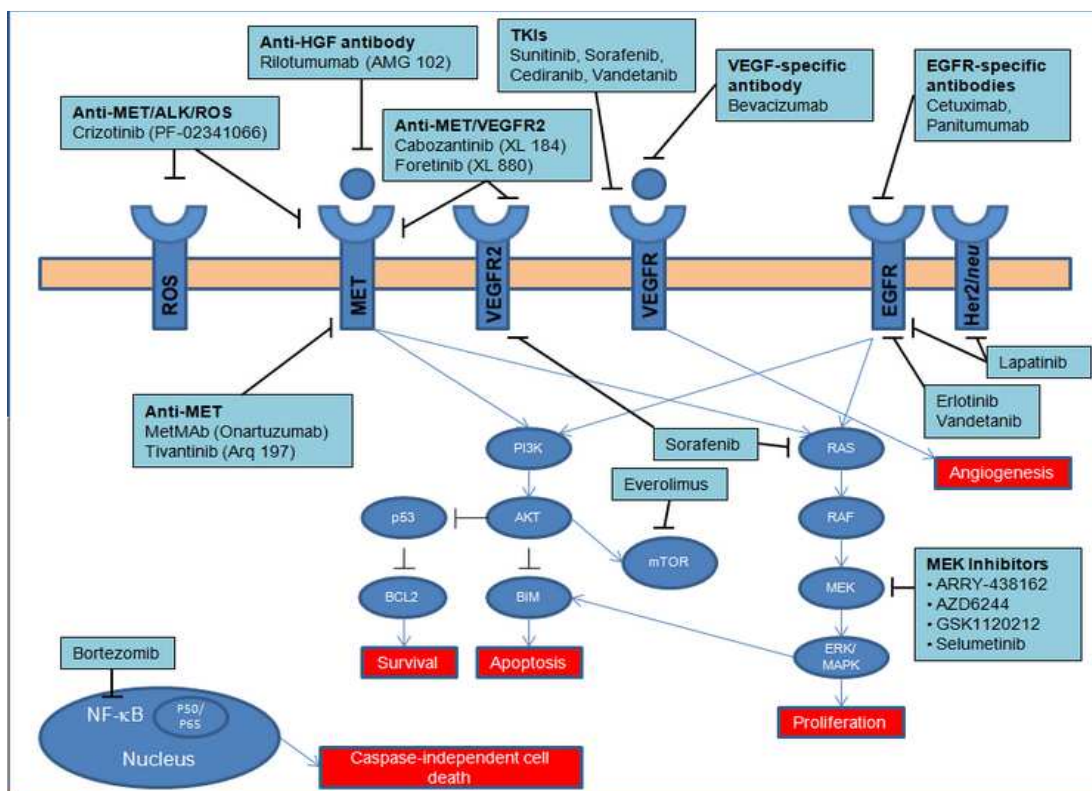


Figura 11. Esquema de los fármacos y las dianas sobre las que actúan.

A pesar del descubrimiento de estas dianas terapéuticas existe un grupo importante de pacientes en los que no se encuentran estas mutaciones “*driver*”, por lo que deben ser tratados con los esquemas clásicos de quimioterapia basadas en dobletes de platino.

Sin embargo, e incluso disponiendo de terapias individualizadas, la adquisición de resistencias a los tratamientos (convencionales o dirigidos contra dianas) es una de las causas principales de la elevada mortalidad del cáncer de pulmón (Han *et al.* 2013).

Actualmente, existe un gran cúmulo de evidencias científicas que indican la relación entre la población de CSC con la aparición de resistencias a los tratamientos, las recidivas y la diseminación tumoral.

Así, mientras que los tratamientos quimioterápicos convencionales están dirigidos a causar daño en el ADN de células de rápida división, las CSC se mantienen en estado de quiescencia con una cinética de división enlentecida. Por esta razón las CSC no son sensibles a los citotóxicos que se están usando actualmente y pueden ser las responsables de la recidiva después del tratamiento. Además las CSC se caracterizan por presentar elevada expresión de bombas detoxificadoras como los transportadores ABC que permiten la expulsión de los fármacos fuera de la célula constituyendo otro de los mecanismos de resistencia al tratamiento (Hirschmann-Jax 2004).

Teniendo en cuenta la implicación de las CSC en la recurrencia del cáncer, y sobre todo en cáncer de pulmón, es interesante realizar una caracterización exhaustiva de la población de CSC pulmonares para su correcta identificación mediante marcadores específicos, conocer su biología, las vías de señalización que están activas en estas células, de manera de poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas que permitan controlar la población de CSC o bien inducir su diferenciación para sensibilizarlas a los efectos de los fármacos usados para el tratamiento de este tipo de tumores (Figura 12).

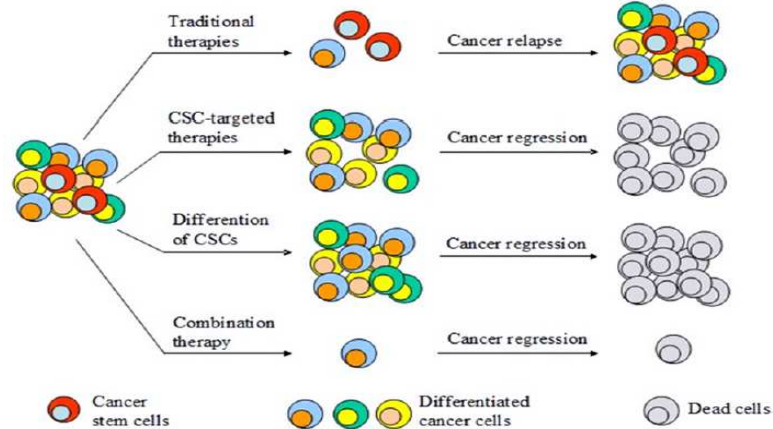


Figura 12. Implicación de las CSCs en las resistencias al tratamiento (Han et al. 2013).

1.3. CÉLULAS MADRE TUMORALES.

Las CSC presentan una serie de características distintivas como son: la autorenovación, es decir la división celular generadora de una o dos células hijas que conservan las mismas propiedades biológicas que la célula madre, la capacidad de generar múltiples linajes celulares, y la capacidad de proliferación ilimitada (Ho et al. 2007).

Se han descrito dos tipos de células madre en función de su totipotencia o multipotencia: las células madre embrionarias (ESC) capaces de dar lugar a todos los tipos celulares de las tres capas germinales y las células madre adultas multipotentes capaces de diferenciarse en varios tipos celulares de un órgano determinado (Gottschling et al. 2012)

Las células madre y las CSC presentan características comunes aunque hay una propiedad que las distingue, las CSC presentan capacidad tumorigénica, la cual está ausente en las células madre convencionales. Es decir, las CSC pueden nuevamente formar el tumor del que se aislaron cuando son trasplantadas a otro huésped. Por tanto las propiedades clave que debe presentar la población de CSC son: a) capacidad de auto-renovación, b) capacidad de diferenciación gracias a la división asimétrica, c) tumorigenicidad y d) expresión de marcadores de superficie característicos (Zhang et al. 2014; Peitzsch et al. 2013).

Las CSC mantienen una estructura jerarquizada, como cualquier otro tipo celular, y se piensa que pueden sufrir tanto división simétrica como asimétrica (Figura 13). Como resultado de la división asimétrica se obtienen dos células hijas diferentes mientras que mediante la división simétrica se generan dos células hija con las mismas características que la célula progenitora.

Este tipo de división es la que parece estar involucrada en el mantenimiento de una población de células madre adultas en el tumor. Por otra parte la división asimétrica parece ser la responsable de que las CSC puedan desarrollar nuevamente el tumor.

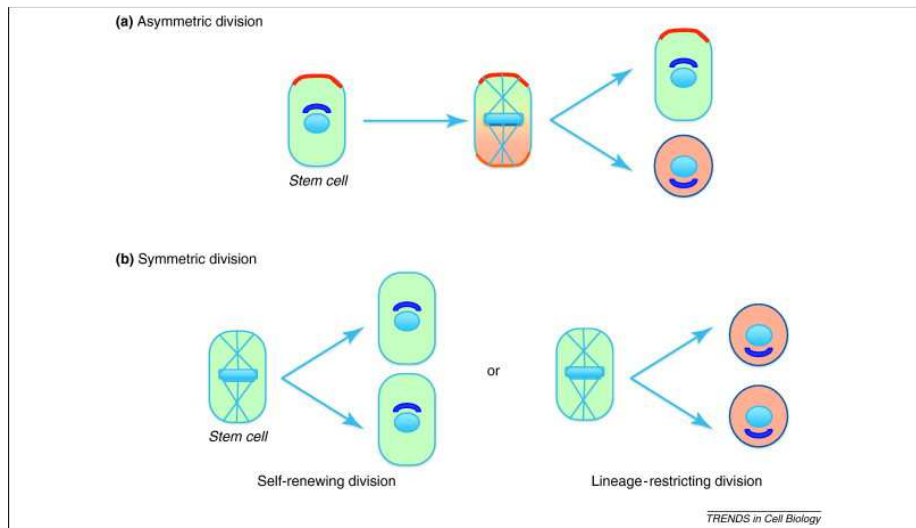


Figura 13. Esquema de los dos tipos de división posible que pueden sufrir las CSC.(McCaffrey & Macara 2011).

Actualmente existe consenso científico en que su origen puede estar en i) células madre que se transforman en cancerosas a través de una mutación, lo que ha sido demostrado en enfermedades mieloproliferativas (Passegue *et al.*, 2004) o ii) células progenitoras de tejidos parcialmente diferenciados que adquieren la capacidad de autorrenovación, mediante la puesta en marcha de mecanismos de dediferenciación y rediferenciación para dar lugar a otro tipo celular, proceso conocido como transdiferenciación (Jamieson *et al.*, 2004; Cozzio *et al.*, 2003; Huntly *et al.*, 2004; Krivtsov *et al.*, 2006).

Hay dos teorías que pueden explicar la tumorigénesis guiada por las CSC (Figura 14). El modelo determinista se basa en la idea de que el tumor se forma a partir de una CSC procedente de una célula tumoral que ha sufrido un proceso de dediferenciación u originada a partir de una célula madre degenerada. Este modelo postula que la CSC da lugar a una progenie de CSCs junto con células tumorales por el proceso de división asimétrica. En contra, el modelo estocástico postula que una o más células tumorales, por acumulación de mutaciones dan lugar a una célula tumoral con fenotipo CSC.

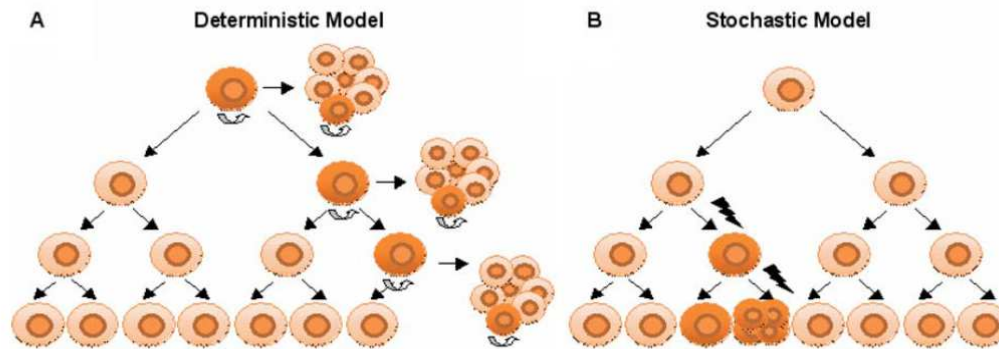


Figura 14. Modelos de desarrollo tumoral a partir de las CSC.(A) Modelo determinista: postula el desarrollo del tumor a partir de una CSC (marrón oscuro).(B) Modelo estocástico postula que es una célula tumoral la que adquiere el fenotipo CSC por acumulación de mutaciones. (Gottschling et al. 2012).

El aislamiento de las CSCs ha sido realizado en varios tipos de tumores como mama, colon y cerebro mediante citometría de flujo con marcadores de superficie tales como CD44, CD133, EpCAM o ALDH1 (Medema 2013; Lugli et al. 2010). No obstante, la expresión de marcadores de superficie que han sido comúnmente utilizados, como CD133 usado para el aislamiento de células madre en tejido sano y tumoral, no es exclusiva ni excluyente (Salnikov et al. 2010; Shmelkov et al. 2008; Wang et al. 2008)(Eramo et al. 2008; Ricci-Vitiani et al. 2007; Singh et al. 2004) (Tabla 2).

Los conocimientos adquiridos hasta ahora establecen que la definición de CSCs basada exclusivamente en marcadores de superficie es insuficiente, por lo que debe ir ligado a marcadores de expresión y ensayos de auto-renovación.

Una particularidad de las células madre que ha permitido su aislamiento es su capacidad de expulsar colorantes como el Hoechst 33342, gracias a la actividad de los transportadores ABC (Zhou *et al.*, 2001). Puesto que se ha visto que la población de células que excluye el Hoechst 33342, denominada *Side Population* (SP), está presente en varios tipos tumorales y está enriquecida en las propiedades de célula madre (Hirschmann-Jax 2004), ha sido una de las más extensamente caracterizadas en diferentes tipos tumorales. No obstante, la identificación de células SP mediante la exclusión de Hoechst 33342 presenta algunos inconvenientes como son la citotoxicidad del colorante y la sensibilidad de las condiciones experimentales (concentración del colorante, el tiempo de incubación o la concentración celular) (Zhong et al. 2007; Montanaro et al. 2004).

Otro método para la identificación y selección de CSC es el basado en la actividad aldehído deshidrogenasa. Esta estrategia ha sido útil para aislar poblaciones de CSC cerebrales (Bar *et al.*, 2007), de pecho (Ginestier *et al.*, 2007), de colon (Huang *et al.*, 2009) y de cabeza y cuello (Chen *et al.*, 2009).

Por otra parte, las CSC presentan la capacidad de crecer en forma de esferas en agar o en medio libre de suero con factores de crecimiento (EGF, ITS y bFGF), Zhang *et al.* y Gani *et al.* consiguieron aislar poblaciones celulares con características propias de CSC.

Por lo tanto, dada la heterogeneidad que caracteriza a los tumores, es de esperar que el fenotipo de la CSC no sea uniforme y subyace la necesidad de identificar marcadores muy específicos o definir combinaciones de marcadores para el reconocimiento de CSCs en cada órgano (15).

Tabla 2. Marcadores de CSC para diferentes tipos de tumores sólidos.(Medema, 2013)

Mama	Colon	Glioma	Hígado	Pulmón	Melanoma	Ovario
ALDH1	ABCB5	CD15	CD13	ABCG2	ABCB5	CD24
CD24	ALDH1	CD90	CD24	ALDH1	ALDH1	CD44
CD44	β -catenin	CD133	CD44	CD90	CD20	CD117
CD90	activity	α_6 -integrin	CD90	CD117	CD133	CD133
CD133	CD24	nestin	CD133	CD133	CD271	
Hedgehog-Gli activity	CD26					
α_6 -integrin	CD29					
	CD44					
	CD133					
	CD166					
	LGR5					

1.3.1. Células Madre Tumoraes en Cáncer de Pulmón.

Las primeras evidencias de CSC en cáncer de pulmón se hallan en los trabajos de Carney en la década de los 80, describiendo una población de células tumorales capaces de crecer en agar (Carney et al. 1980). Además, en años posteriores reafirmaron sus hallazgos con la inoculación de estas células en ratones inmunodeprimidos y la consiguiente generación del mismo tipo de tumor del que se aislaron las células (Carney et al. 1982). Desde entonces, numerosas investigaciones se han centrado en el aislamiento de CSC pulmonares humanas usando marcadores específicos de este tipo celular.

En 2005 se publican las primeras evidencias de la existencia de CSC en CPNM en un modelo de ratón con una mutación inducible en *KRAS* (Bender Kim et al. 2005). En el mismo sentido, Ho et al. demostraron la presencia de una subpoblación ("*side population*", SP) que constituía un mínimo porcentaje (del 0,03% al 6,1%) de la población celular de la masa tumoral. que era capaz de regenerar todos los tipos celulares del tumor y mostraba características como mayor tumorigenicidad, capacidad hiperproliferativa y resistencia a varios citostáticos. Se observó a la vez que esta población de células presentaba una expresión elevada de transportadores dependientes de ATP (*ABC*) y de *hTERT* (Ho et al. 2007). CD133 parece ser un marcador capaz de identificar a estas células de CPNM que presentaban características propias de células madre (Chen et al. 2013; Eramo et al. 2010; Levina et al. 2008). En algunos casos, tras el tratamiento con agentes citotóxicos, se ha descrito una población de CSC CD133+, (Bertolini G, et al. 2009), aunque el valor como biomarcador se cuestiona ya que también se han encontrado casos de poblaciones celulares CD133⁻ con características propias de CSC.

Otro marcador relacionado con propiedades típicas de CSC y que se postula como marcador específico de adenocarcinoma de pulmón es la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH-1). Esta enzima tiene una función detoxificadora por lo que participa en la resistencia al tratamiento que ofrecen las CSC. Además, en CPNM se ha observado que células que muestran elevada expresión de este marcador presentan alta tumorigenicidad y capacidad de renovación. En relación a esto, un alto nivel de expresión de *ALDH1A1* parece estar relacionado con la activación de la ruta Notch (Sullivan et al. 2011).

En relación con su papel como biomarcadores, Alamgeer y colaboradores demostraron que los pacientes diagnosticados de CPNM estadio I que presentaban altos niveles de expresión de *CD133* y *ALDH1* tenían una menor supervivencia global a 5 años (Alamgeer et al. 2013).

Tanto en mama como en pulmón se observó que la división asimétrica generaba células en estado quiescente que resistían a tratamientos neoadyuvantes. Proteínas como AKT, IGF-1R, PKC, PI3K o PTEN parecen estar involucradas en el estado de quiescencia y la asimetría a la hora de la división celular. Como se sabe, la mayoría de los fármacos citostáticos afectan sobre todo a células de rápida división, por lo que la quiescencia puede ser un mecanismo de escape al daño en el ADN que producen este tipo de tratamientos. Además la población de CSC se caracteriza por expresar en mayor medida proteínas reparadoras de daños en el ADN y de bombas detoxificadoras como ABCG2 que permiten expulsar los fármacos al exterior, manteniendo una menor concentración citoplasmática del fármaco (Liang et al. 2015; Robey et al. 2007).

EpCAM es una glicoproteína transmembrana que participa en el equilibrio entre proliferación y diferenciación celular. En tejido sano, altos niveles de EpCAM se relacionan con proliferación, regeneración tisular y mantenimiento de células madre. En varios tumores de origen epitelial se han encontrado altos niveles de expresión de EpCAM que se corresponden con un peor pronóstico (Schnell et al. 2013). Además también se ha observado un alto nivel de expresión de EpCAM en células metastásicas y en CSC, de modo que un alto nivel de expresión de EpCAM se asocia con un peor pronóstico así como a cánceres más agresivos (Patriarca et al. 2012; Trzpis et al. 2007).

CD166, conocido también como ALCAM, es una proteína transmembrana altamente conservada perteneciente a la súper familia de las inmunoglobulinas. Se encuentra expresada en varios tejidos como tejido neuronal, en el epitelio, en el sistema inmunitario así como en células madre hematopoyéticas. CD166 tiene un papel importante en procesos biológicos como la activación de células T, angiogénesis y hematopoyesis. En cáncer de pulmón se ha observado una asociación entre la expresión de ALCAM en tumores poco agresivos, pequeños y sin afectación linfática, aunque la relación entre la expresión de ALCAM y el pronóstico en este tipo de tumores no es concluyente (Tachezy et al. 2014).

En base a estos hallazgos no hay duda de la existencia de CSC en CPNM (Peacock & Watkins 2008), pero aún se deben aunar esfuerzos para establecer marcadores fiables para las CSC pulmonares, estudiar las cascadas de señalización características de esta población que nos ayuden a desarrollar fármacos con el potencial de actuar sobre las CSC y con el objetivo final de minimizar el riesgo de recurrencia en pacientes con cáncer de pulmón.

1.3.2. Principales vías de señalización implicadas en el mantenimiento y regulación de las CSCs.

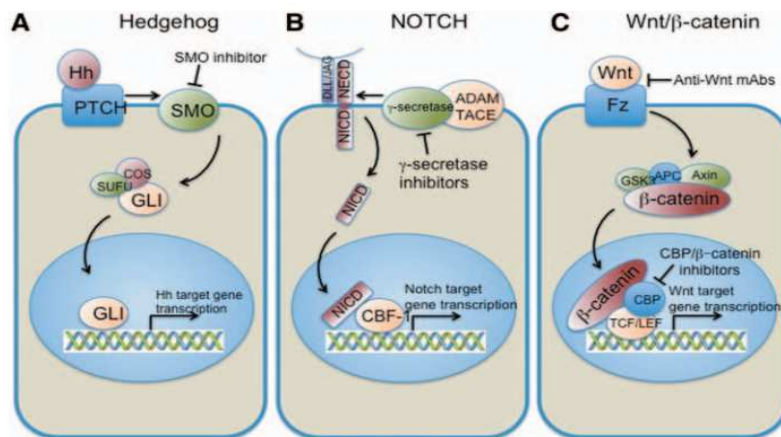


Figura 15. Rutas de señalización implicadas en la regulación y el mantenimiento de las CSC.(Flaherty et al. 2012).

Las vías de señalización Notch, Wnt y Hedgehog (Figura 15) son las responsables del mantenimiento de las células madre normales y tumorales interviniendo en procesos como la polaridad y destino celular, migración, polarización o apoptosis (Stewart 2013; Evangelista et al. 2006; Lai 2004). Hay evidencias de la activación de estas rutas en cánceres gástricos y de mama (Stylianou et al. 2006; Shojima et al. 2015; Song et al. 2011) así como en cáncer de pulmón (Westhoff et al. 2009; Stewart 2013) lo que sugiere la presencia de una subpoblación de CSC mantenida por la activación de estas cascadas de señalización celular. También parecen estar implicadas en la transición epitelio-mesenquimal en las que las células ganan características mesenquimales como motilidad y resistencia a la apoptosis y pierden la adhesión célula-célula y la polaridad, contribuyendo al fenotipo CSC (Yuan et al. 2014; Maitah et al. 2011).

Vía de señalización Notch en cáncer.

La ruta Notch es una ruta de señalización célula –célula que está altamente conservada en los mamíferos y tiene un papel clave en desarrollo normal del organismo, participando en procesos como la diferenciación, migración, proliferación y apoptosis (Lai 2004). No obstante, a pesar de ser una ruta altamente conservada durante la evolución, el resultado de la señalización vía NOTCH es diferente y muchas veces contradictorio en distintos contextos celulares (Figura 16). Una hipótesis que explicaría en parte estos hechos propone que la ruta

de señalización Notch podría estar sometida a control a nivel de ligando o a nivel de receptor, de manera que distintos receptores dan lugar a diferentes programas de expresión génica y por lo tanto, a efectos diferentes según el entorno o tejido en el que se esté estudiando su implicación (Wilson & Radtke 2006).

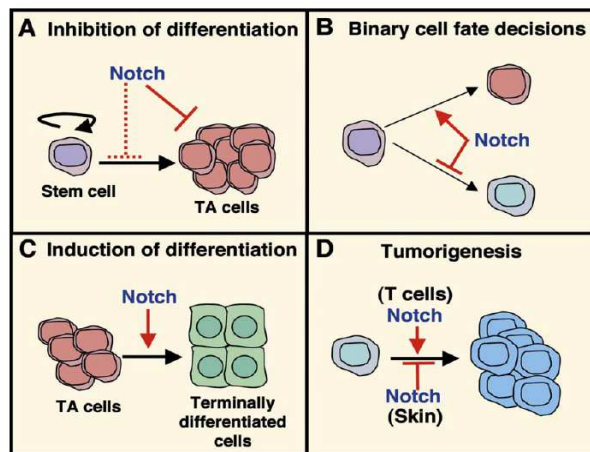


Figura 16. Efectos pleiotrópicos de la activación de la vía Notch. A. La activación de Notch mantiene a las células madre y a los progenitores de las células de la cripta intestinal (TA) en estado indiferenciado mientras que en la piel (C) promueve la diferenciación terminal. B. En la línea linfocítica, Notch especifica la diferenciación en célula T, en detrimento de célula B, a partir de un progenitor común. D. Notch induce la tumorigénesis (en células T) o actúa como un mecanismo supresor de tumores (en la piel) en función del tejido. (Wilson & Radtke 2006).

Los componentes principales de la cascada de señalización son, por una parte, los ligandos Delta-1, -3, -4 y Jagged 1 y 2, y por la otra los cuatro receptores transmembrana conocidos como Notch 1, 2, 3, y 4. Estos receptores comparten la misma estructura, en un principio se sintetizan como precursores que serán escindidos en dos péptidos asociados durante la translocación a la membrana plasmática (

Figura 17). La proteína funcional se compone de un dominio extracelular de unión a ligando anclados a la membrana plasmática. La estructura que interaccionará con el ligando presenta unos dominios tipo EGF repetidos. El dominio intracelular presenta dominios tipo RAM conservados implicados en la unión con el factor de transcripción CSL (CBF1, *suppressor of hairless*, Lag-1), así como dos dominios que permitirán la translocación al núcleo de la célula una vez se reciba la señal extracelular (Figura 17).

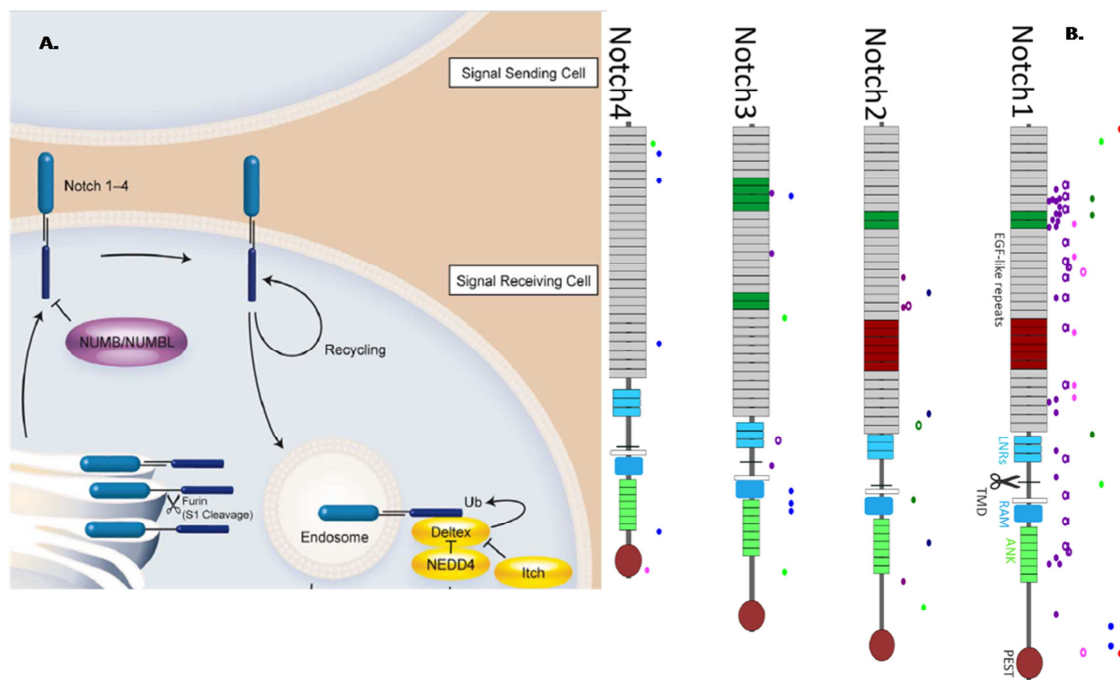


Figura 17. Proceso de translocación a la membrana plasmática A. y estructura B. de los receptores Notch 1-4.A. Procesamiento del precursor del receptor Notch en el retículo endoplásmico y en Golgi donde se forma el receptor funcional que es translocado a la membrana plasmática. B. Fracción extracelular de unión a ligando compuesta por repeticiones tipo EGF que promueven la activación de la vía (■) o que inhiben la vía (■). Zona de corte S1 (✂) que escindirá el precursor en dos péptidos asociados. Dominios RAM (■), ANK (■) y el dominio de destrucción PEST (●). Mutaciones “missense” (●) y “non-sense” (○) en distintos tipo de tumores: HNSCC (●,○), glioma (●,○), cáncer de pulmón epidermoide (●,○) y adenocarcinoma (●,○), mama (●,○) y ovario (●,○).

La cascada de señales se inicia con la unión del ligando Delta o Jagged, expresado por una célula proximal, al dominio extracelular del receptor que inducirá el mecanismo de activación del receptor consistente en dos eventos proteolíticos, uno a nivel extracelular y uno a nivel transmembrana llevado a cabo por el complejo γ -secretasa. A este nivel, NUMB actúa como un regulador negativo de la vía de señalización Notch. Tras estas dos escisiones, el dominio intracelular de NOTCH (NICD) sufre una translocación al núcleo, donde interacciona con el factor de transcripción CSL. La interacción de NICD con CSL induce el reclutamiento de distintos co-activadores, de manera que CSL pasa de ser un represor a un activador de la transcripción. Las dianas directamente relacionadas con esta ruta de señalización son factores de transcripción de la familia HES/HEY, así como otros factores relacionados con la diferenciación, reguladores del ciclo celular como p21 y ciclina D1, y reguladores de la apoptosis (Egloff & Grandis 2012; Shih & Wang 2007).

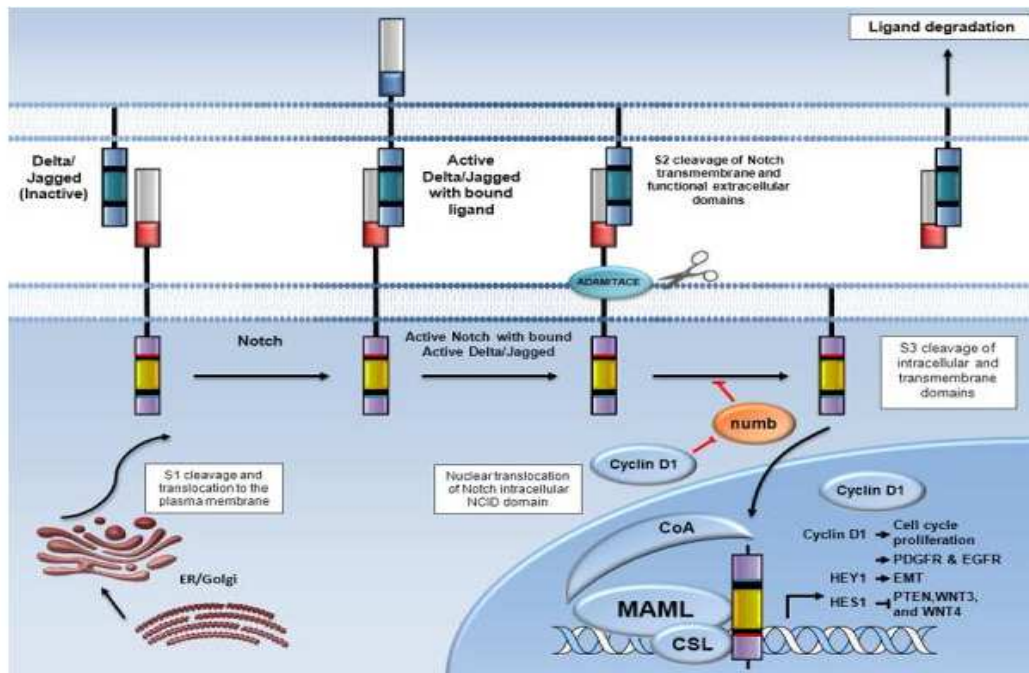


Figura 18. Mecanismo de activación de la ruta de señalización Notch. (Yu et al. 2012)

Por tanto, la activación de la ruta de señalización NOTCH da lugar a una inducción de la proliferación a través de ciclina D1 (*CCND1*), a la expresión de *PDGFR* y *EGFR*, a la inducción de la transición epitelio mesenquimal a través de la activación de *HEY1* y a la inhibición de *PTEN*, *WNT3* y *WNT4* mediante la activación de *HES1* (Figura 18) (Yu et al. 2012).

Las primeras implicaciones de la ruta Notch en cáncer se establecieron en la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) (Weng et al. 2004). En tumores sólidos, hay evidencias de sobreexpresión de la ruta Notch mediada por los ligandos de la familia Jagged en carcinoma de próstata (Santagata et al. 2004), cáncer renal (Rae et al. 2000), o cáncer de páncreas donde esta ruta de señalización se postula como mediador de las lesiones pre-cancerosas. La hiperactivación de esta ruta en los distintos tipos de tumores parece estar relacionada con la activación de la ruta Ras (Xu et al. 2014).

La implicación de esta ruta en cáncer de pulmón se estableció experimentalmente en un modelo de ratón transgénico en el que la ruta Notch estaba específicamente activada en el epitelio alveolar, además, junto con la expresión de c-MYC se conseguía mimetizar el desarrollo de adenocarcinomas humanos (Allen et al. 2011). Al mismo tiempo, se comprobó que una inhibición de esta ruta inhibía el desarrollo de adenocarcinomas en modelo de ratón K-RasG12D (Xu et al. 2014).

No obstante, no en todo tipo de tumores se encuentra sobreexpresada la ruta Notch, por ejemplo en cáncer de pulmón microcítico (CPM), de origen neuroendocrino, esta ruta se presenta inactiva. Sin embargo, datos recientes indican que en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) la ruta NOTCH se encuentra hiperactivada induciendo altos niveles de expresión de sus genes diana: *CCND1*, *MYC*, *NFKB*, *P21* y *P27*, *SLUG* y *NANOG* (Niessen et al. 2008); y activando a los factores de transcripción *HES1*, *HEY1* (Yuan et al. 2014).

La sobreexpresión de la ruta NOTCH en CPNM podría deberse a dos alteraciones principales i) una pérdida de expresión de *NUMB*, inhibidor de la ruta, (por aumento en la degradación de la proteína) y ii) por mutaciones de ganancia de función en *NOTCH1* (Westhoff et al. 2009).

De los cuatro receptores que participan en la ruta NOTCH, *NOTCH1* y *NOTCH3* parecen tener un papel más importante en el desarrollo de CPNM. Se ha determinado que *NOTCH1* promueve el desarrollo de CPNM, bajo condiciones de hipoxia, promoviendo la regulación de *IGF1R* vía *AKT/PTEN* y survivina que potencian la supervivencia y la proliferación celular (Chen et al. 2011; Elias et al. 2010). Esto supone que la hipoxia favorece la supervivencia de las CSC. Por otra parte, se evidencia una interacción entre *NOTCH3* y la ruta *EGFR*, que da como resultado una inhibición del proceso apoptótico gracias a la expresión de la proteína *bim* con función anti-apoptótica (Konishi et al. 2010).

En cuanto al efecto que tiene sobre el paciente la sobreexpresión de esta ruta, el trabajo de Donnem et al. pone de manifiesto el valor pronóstico de los ligandos y receptores que componen la ruta Notch, en el sentido que niveles elevados de *NOTCH1*, así como de sus ligandos *Jagged* se correlacionan con un peor pronóstico en CPNM. Además el proceso de angiogénesis mediado por NOTCH, mediante la co-expresión de *NOTCH1/VEGFA*, está involucrado en la generación de metástasis (Donnem et al. 2010).

Vía de señalización Wnt en cáncer.

La vía de señalización Wnt, está involucrada en el mantenimiento y la proliferación de las CSC. Las principales proteínas que la activan son las *wnt*, proteínas unidas a ácidos grasos que contienen una gran cantidad de cisteínas conservadas. Dichos ácidos grasos, son fundamentales para la señalización y la secreción correcta de estas proteínas (Clevers & Nusse 2012).

La ruta Wnt, se puede diferenciar en dos vías diferentes: una vía predominante, que es la vía canónica, cuya activación está mediada por las proteínas WNT 1,2,3, y cuyo efecto está mediado por la acumulación citoplasmática de la proteína β -catenina. Por otro lado, la vía no-canónica, menos común, está activada por WNT5A, e induce la activación de otras cascadas de señalización (Anastas & Moon 2013; Stewart 2013). La β -catenina, es una proteína multifuncional que juega un papel fundamental en la homeostasis fisiológica, actuando como un co-regulador transcripcional y un adaptador proteico para la adhesión intracelular. En ausencia de expresión de las proteínas WNT, la β -catenina se fosforila por acción de GSK3 β , sufriendo una ubiquitinación y posteriormente una degradación por el proteosoma celular. Cuando la ruta de Wnt está activada, la β -catenina no se degrada y se acumula en el citoplasma, donde forma un complejo junto con TCF (factor de célula T) que es trasladado al interior del núcleo. Allí, se estimula la transcripción génica debido al desplazamiento de los co-represores *Groucho-HDAC* (Stewart 2013).

Varios estudios, han demostrado la relación entre acumulación nuclear entre el complejo TCF/ β -catenina y transformación cancerosa de las células. También se ha demostrado como un modulador clave en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas, y se ha sugerido su relación con la capacidad metastásica, al aumentarlas capacidades invasivas y migratorias de las células. Forma parte de la regulación de la transición epitelio-mesenquimal, y se asocia a la resistencia a quimioterapia y mantenimiento de las CSC (Figura 19).

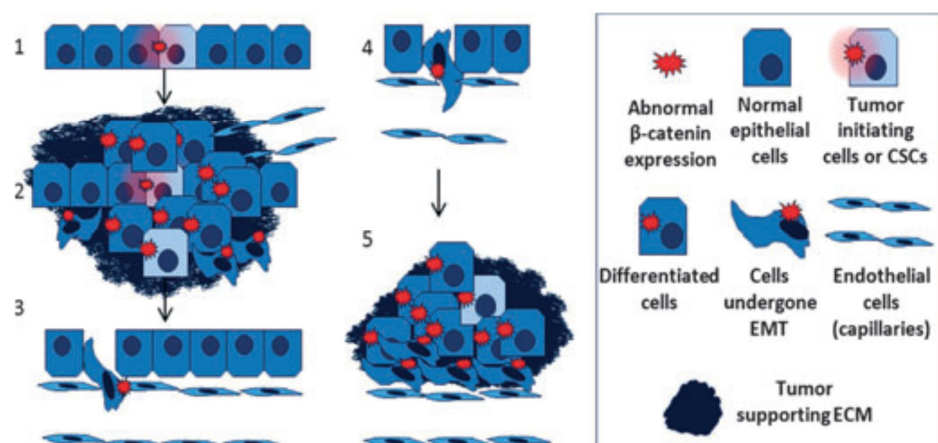


Figura 19. Papel de β -catenina en la tumorigénesis. La β -catenina participa en el desarrollo tumoral a distintos niveles: (1) transformación en célula cancerosa, (2) proliferación, renovación y diferenciación de células tumorales, anjiogénesis y transición epitelio-mesenquimal, (3 y 4) invasión y extravasación y (5) metástasis. (Thakur et al, 2013)

La inhibición específica de la β -catenina se podría traducir en la reversión de las propiedades cancerosas de las células tumorales (Kim et al, 2002). La mayoría de las investigaciones que están actualmente en progreso, se centran en bloquear el complejo TCF/ β -catenina e inducir la muerte celular.

La vía canónica Wnt, es la vía de acción mayoritaria y está mediada por las proteínas WNT 1,2,3 junto con la porcupina, ya que la acción de ésta permitirá la unión de *wnt* con su receptor. Cuando no se produce la sobreexpresión de WNT, la β -catenina sigue su ruta común, siendo degradada en el citoplasma por el complejo de destrucción de la β -catenina (Figura 20). Este complejo, está formado por CK1a, AXIN, APC y GSK3 β ; este último es el responsable de la fosforilación de la β -catenina, que será ubiquitinilada y degradada vía proteasoma como comentamos anteriormente.

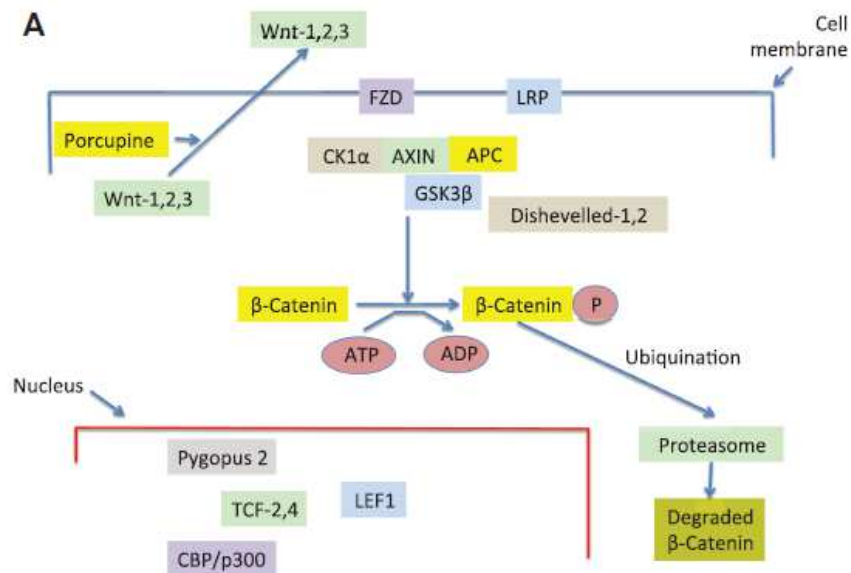


Figura 20. Ruta canónica de la vía Wnt, en condiciones de no sobreexpresión de WNT. (Stewart D, 2013)

Por el contrario, cuando la proteína WNT está sobreexpresada, el progreso de la ruta cambia por completo (Figura 21). La porcupina actúa como mediador, activando las proteínas WNT para permitir su unión al receptor Frizzled(FZD) de membrana, formando un complejo junto a LRP(*lipoprotein related-receptor protein*) que es capaz, a su vez, de unirse al complejo de destrucción de la β -catenina. Para ello, la porcupina realiza una acetilación sobre las proteínas *wnt*, lo que estimulará su N-glicosilación necesaria para su secreción (Chen et al, 2008). En este punto, aparece la proteína disvehelled-1,2 (DVL), que es fosforilada y es capaz de actuar como un inhibidor de GSK3 β , anulando el complejo de destrucción de la β -catenina, y provocando su acumulación en el citoplasma celular. Esta acumulación provoca dos efectos diferentes: por un lado, la β -catenina se trasloca al núcleo celular, e inicia la transcripción de multitud de genes involucrados en factores de crecimiento celular y la resistencia a quimioterapia y radioterapia, como *CCND1*, *MYC* o *BIRC5* y por otro, la acumulación de β -catenina favorece su interacción con E-cadherina, lo que provoca un aumento de la adhesión celular, disminuyendo así la malignidad del tumor, aunque el efecto neto resulta en un aumento de la agresividad tumoral.

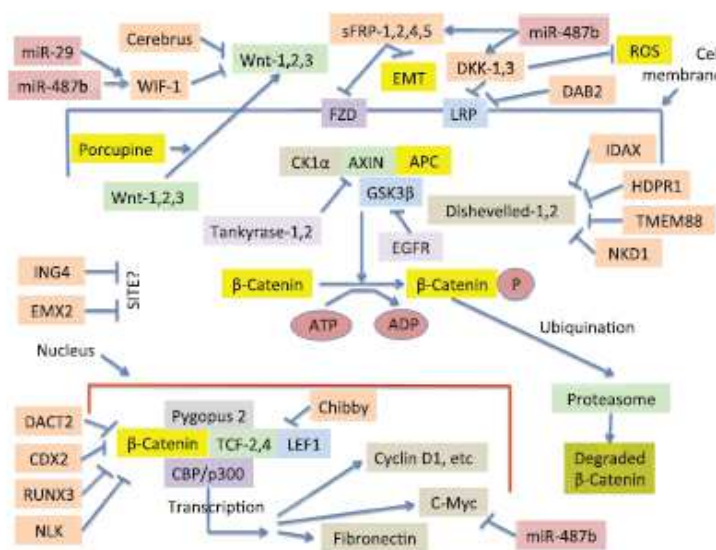


Figura 21. Inhibidores de la ruta canónica de la vía Wnt.(Stewart D, 2013).

La sobreexpresión de Wnt no se traduce siempre en un inicio de malignidad, la ruta Wnt, posee una gran cantidad de inhibidores que afectan a todos los puntos de la vía, desde la secreción de WNT, hasta la acción de *dishevelled-1,2*, pasando por los diferentes complejos que se forman. Entre los inhibidores, podemos destacar los miembros de la familia Dickkopf (DKK), 4 glicoproteínas secretadas que inhiben la señalización de WNT mediante su unión a LRP 5/6, un componente del complejo de unión a WNT.

La ruta no canónica de Wnt está regulada por la expresión de otras proteínas de la familia wnt, entre las que predomina WNT5A, y es independiente de β -catenina. La sobreexpresión de esta proteína, genera un complejo junto con FZD, ROR2 y DV L-3 en la membrana celular, lo que conduce a la activación de nuevas vías de señalización secundarias. Estas vías, son la vía del flujo de calcio y la vía de polaridad planar celular/extensión convergente (PCP) (Figura 18).

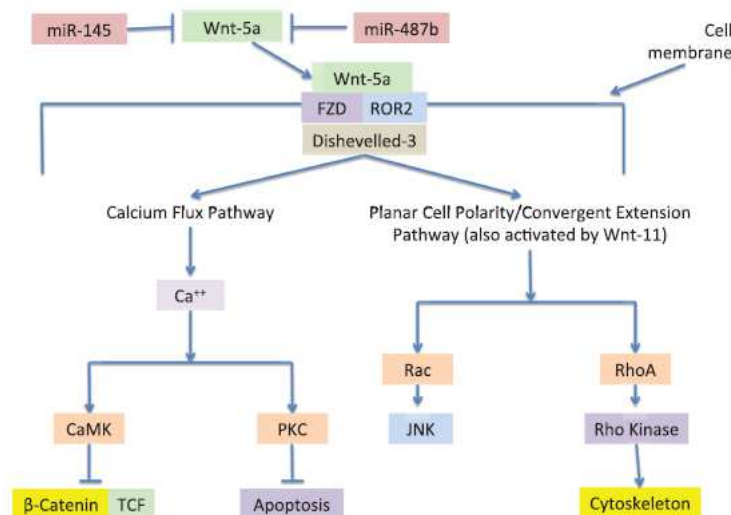


Figura 22. Ruta no canónica de la vía Wnt. La activación de la ruta no canónica se da por la expresión de Wnt5A.

La movilización de Ca^{++} intracitoplasmático estimula la producción de CaMK, un inhibidor del complejo β -catenina/TCF, que provoca la inhibición de la vía canónica, y la producción de PKC, un inhibidor de la apoptosis. La vía de la PCP actúa a través de pequeñas GTPasas como RHO, RACo CDC42, activándolas mediante las proteínas DVL, cuya interacción está implicada en la tumorigénesis pulmonar, principalmente en los procesos de adhesión celular y migración y en la disminución de los procesos apoptóticos en las células tumorales (Kikuchi et al. 2012; Mazieres et al. 2005).

Actualmente, en la literatura no hay mucho descrito en cuanto al papel pronóstico de la vía Wnt en CPNM. Además la mayoría de los trabajos en este sentido se han llevado a cabo en modelos *in vitro* (Stewart 2013).

Vía de señalización Hedgehog en cáncer.

La vía de señalización formada por las proteínas de la familia Hedgehog está intrínsecamente implicada en diversos procesos de desarrollo, como la organogénesis pulmonar, y está involucrada en procesos de señalización de células madre, regeneración y reparación de tejidos (Lauth et al. 2007). Sin embargo, es frecuente encontrar una activación constitutiva de esta vía en diversos tipos de cáncer, como mama, gástrico, páncreas o pulmón (Velcheti & Govindan 2007).

La vía Hedgehog está formada principalmente por los siguiente componentes: el ligando extracelular, del que existen tres variantes: deserthedgehog (*DHH*), Indianhedgehog (*IHH*) y *Sonic hedgehog* (*SHH*), que es el más común de todos; dos receptores homólogos transmembrana, *PTCH1* y *PTCH2*; un receptor acoplado a proteína G (*SMO*) y una familia de factores de transcripción, *GLI*. Dentro de estos factores, *GLI1* actúa como un activador de la transcripción, mientras que *GLI2* y *GLI3*, de la misma familia, pueden actuar siendo inhibidores o activadores transcripcionales (Velcheti & Govindan 2007).

Como se muestra en la Figura 23, en ausencia de ligando la vía permanece inactiva, ya que el receptor *PTCH* se encuentra reprimiendo a *SMO*, y por lo tanto inhibiendo la vía y la transcripción de los genes que regula. Como se observa en la imagen (Figura 23), cuando el ligando está presente y se une a *PTCH*, este sufre una alteración de sus interacciones con *SMO*, de modo que deja de reprimirlo. En este punto, se inicia la cascada de señalización, liberando a *GLI* en estado activo al citoplasma que se traslocará al núcleo, lo que da lugar a la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran varios de la familia de las ciclinas (B, D o E), involucradas en la regulación del ciclo celular, e inhibiendo genes como *p21* o *p53* (Velcheti & Govindan 2007).

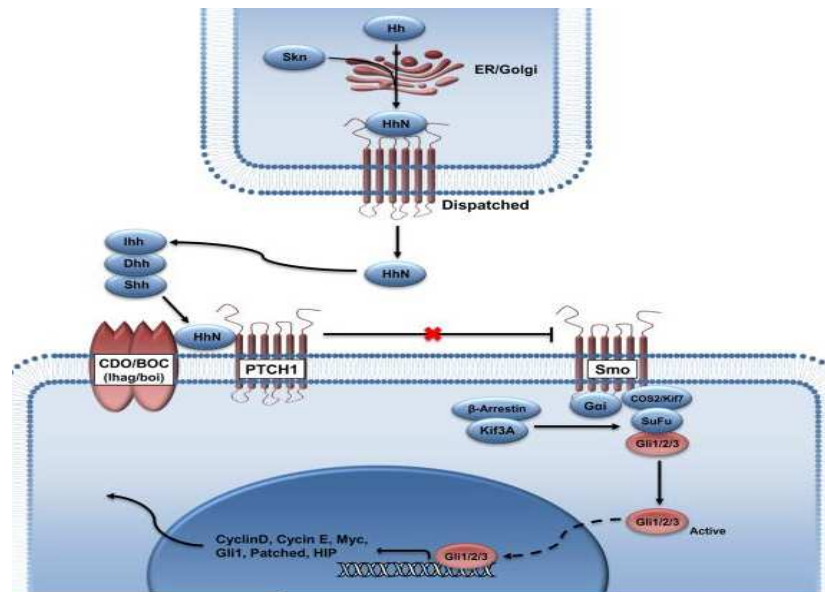


Figura 23. Activación de la ruta Hedgehog.(Yu et al. 2012)

En el epitelio pulmonar de humano adulto, la vía Hedgehog permanece inactivada excepto en las células madre epiteliales. En cáncer de pulmón, diferentes estudios en líneas celulares han demostrado expresión de *SHH*. En muestras de tejido tumoral, se ha observado que el 50% de las muestras de CPM sufren una expresión alta de *SHH* y *GLI*, mientras que en CPNM solo ocurre en el 10% de los casos (Watkins et al. 2003).

Actualmente, se están investigando las posibilidades de usar diversos pasos de la vía como dianas terapéutica. Algunos estudios buscan antagonistas de *SHH* e inactivadores de *SMO* como posibles estrategias terapéuticas, pero presentan problemas cuando las alteraciones se encuentran en las etapas posteriores de la vía. Por ello, otros estudios buscan en *GLI* una diana mediante su bloqueo con agonistas de la proteína-quinasa A (Shindo et al. 2005).

1.4. BIOMARCADORES EN CÁNCER.

El término biomarcador hace referencia a cualquier característica objetivamente medible y evaluable que sea indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas/farmacodinámicas frente a intervenciones terapéuticas (Simon 2005). En el pasado los biomarcadores eran esencialmente indicadores fisiológicos (temperatura corporal, tensión arterial, etc), pero recientemente, el término biomarcador se está transformando en un sinónimo de biomarcador molecular.

Las características que se requieren para un buen biomarcadores podrían resumirse en:

- a. El material de partida debe ser fácil de obtener.
- b. La medición debe ser rápida, sensible y específica.
- c. Los resultados entre diferentes laboratorios no deben diferir significativamente.
- d. Bajo coste.
- e. Eficacia probada para el pronóstico o la predicción en grupos bien caracterizados y varios estudios independientes

En Oncología Médica se trabaja, fundamentalmente, con tres tipos de marcadores: marcadores de diagnóstico, conocidos como marcadores tumorales, que permiten obtener una correlación con la respuesta clínica; marcadores de pronóstico que determinan el efecto del tumor sobre el curso de la enfermedad, de manera independiente al tratamiento y marcadores predictivos que son características propias del paciente o del tumor que proporcionan información sobre el posible beneficio de un tratamiento (Coate et al. 2009).

Las características clínicas de los pacientes se usan rutinariamente como marcadores que facilitan información sobre el diagnóstico y pronóstico de su enfermedad. Las variables clínico-patológicas que se evalúan para seleccionar el tratamiento que se administrará a un paciente oncológico son: la edad del paciente, el estado funcional (ECOG-PS), el estadio de la enfermedad o el tipo histológico, entre otras. Actualmente, las tecnologías “ómicas” como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica aportan información relevante sobre la biología molecular del tumor, permitiendo una caracterización más específica e individualizada de los tumores siendo estas técnicas cada vez más empleadas en la práctica clínica habitual (Saijo 2012).

No obstante, en cáncer de pulmón no son suficientes para predecir de forma eficiente el curso de la enfermedad por lo que se plantea la búsqueda de marcadores que permitan un diagnóstico precoz, una asignación más precisa del pronóstico y una mejor elección del tratamiento y, en caso de resistencias a las terapias administradas, poder seleccionar la mejor estrategia terapéutica para tratar a estos pacientes.

Lamentablemente, en cáncer de pulmón, las recaídas tempranas y las resistencias a los tratamientos se presentan en un alto porcentaje de pacientes y, como ya se ha mencionado anteriormente, la población de CSC parece estar relacionada con este tipo de eventos. Sin embargo, no existen hasta el momento marcadores específicos de las CSC pulmonares que puedan ser usados para su aislamiento a partir de tejido tumoral (Zakaria et al. 2015; Swarts et al. 2013). Por tanto, se llega a la conclusión de que es necesaria una búsqueda de marcadores que puedan discriminar específicamente entre CSC y células madre normales, además de conocer en profundidad las características biológicas distintivas de las CSCs para poder diseñar terapias que ataquen específicamente a esta población celular.

En este trabajo se propone el análisis de expresión de genes de las rutas de señalización Notch, Wnt y Hedgehog que gobiernan los procesos de regulación de las CSC, así como los genes *EPCAM1*, *ABCG2*, *ALDH1A1*, *ALCAM* que se describen en varios trabajos como marcadores del fenotipo CSC como posibles biomarcadores en CPNM en estadios resecables. La validación de estos genes como marcadores específicos de CSC facilitaría información sobre el pronóstico de la enfermedad y permitiría diferenciar aquellos pacientes con mayor probabilidad de recidiva.

2. OBJETIVOS.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de genes pertenecientes a las principales rutas de señalización que son responsables de la proliferación y del mantenimiento de la población de CSC además de la expresión los genes *EPCAM1*, *ALDH1A1*, *ABCG2* y *ALCAM* que caracterizan a estas células en muestras pareadas de tejido sano y tumoral procedentes de pacientes diagnosticados de CPNM en estadios resecables y establecer una relación entre la expresión de estos genes y las características clínico-patológicas de los así como su valor como biomarcadores de pronóstico de esta enfermedad.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1. Preservar correctamente las muestras quirúrgicas de pacientes con CPNM resecable para luego aislar ARN de tejido tumoral y tejido sano adyacente con parámetros de calidad suficientes para llevar a cabo análisis moleculares que permitan cuantificar la expresión génica de los genes seleccionados mediante la técnica RT-qPCR.
2. Determinar la expresión génica relativa, a nivel de ARNm, de los genes *NOTCH1*, *HEY1*, *NOTCH3* (vía Notch), *DKK1*, *FZD7*, *WNT1*, *WNT5A*, *MYC* y *CCND1* (vía Wnt), *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* (vía Hedgehog), *EPCAM1*, *ALDH1A1*, *ABCG2* y *ALCAM*, todos ellos implicados por una parte en el mantenimiento y proliferación de las CSC y por otra, responsables de algunas de las características distintivas que caracterizan a la población de CSC.
3. Analizar las posibles correlaciones entre la expresión génica relativa de los genes analizados.
4. Evaluar la relación de los niveles de expresión génica de los genes estudiados con las variables demográficas y clínico-patológicas más relevantes en la población: edad, sexo, hábito tabáquico, tipo histológico del tumor, PS-ECOG, tamaño del tumor, infiltración linfática y estadio.
5. Analizar la utilidad de la cuantificación de la expresión génica relativa de estos genes de manera individual o en combinaciones como biomarcadores de pronóstico en CPNM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Cohorte de pacientes.

La cohorte de pacientes que compone este estudio está constituida por 178 pacientes con CPNM es estadios reseables (I-III A) procedentes del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) entre los años 2004 y 2013. Los pacientes presentaban un diagnóstico de CPNM temprano y no recibieron ninguna clase de tratamiento neoadyuvante. Todos los pacientes aceptaron participar voluntariamente en este estudio firmando el correspondiente consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo siguiendo lo establecido en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético del CHGUV.

3.2. Obtención de muestras y aislamiento de ARN.

Las muestras de tejido pulmonar sano y tumoral, seleccionados por un patólogo experimentado, se obtuvieron a partir de resección quirúrgica, se conservaron en solución RNAlater[®] (Life Technologies) con el fin de preservar y estabilizar el ARN y fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

La extracción de ARN de tejido sano y tumoral se realizó utilizando TriReagent[®] (Life Technologies), que combina tiocianato de guanidinio y fenol en una solución monofásica para la rápida inhibición de la actividad RNasa. En primer lugar, se disecciona una alícuota de 10-20 mg representativa del tejido con la ayuda de un bisturí estéril y se vuelve a congelar el tejido restante para estudios posteriores. El tejido diseccionado se transfiere a un tubo estéril y se le añade 1 ml de TriReagent[®] y se homogeniza en un agitador de alta velocidad, TissueLyser[®] (Qiagen) a 25°C durante 5 minutos. A continuación se añade cloroformo (en una proporción 1:5, que ayudará a solubilizar la fracción lipídica del tejido, tras 5 minutos de incubación a 25°C en agitación se realiza una centrifugación (12000 g, 15 minutos, 4°C) para separar las diferentes fases: la fase superior acuosa e incolora con el ARN, la interfase y la fase orgánica roja contienen el ADN y la fracción proteica respectivamente.

Se transfiere a un nuevo tubo la fase superior que contiene el ARN, preservándose la fase orgánica (que contiene ADN y proteínas) en 300 µl de etanol absoluto a -20°C para su posterior extracción. Para aislar el ARN presente en la fase acuosa superior se lleva a cabo una precipitación con isopropanol (relación isopropanol-TriReagent 1:2), seguida de un paso de

centrifugación (12000 g, 10 minutos, a 4°C), Se descarta el sobrenadante, y el pellet conteniendo el ARN se lava dos veces con etanol 75%. Tras lavar el pellet, se deja secar para eliminar totalmente cualquier resto de etanol. Finalmente, se resuspende en 50 µl de agua libre de RNasa y se incuba a 55°C durante 5 minutos para lograr la resuspensión del ARN.

3.3. Cuantificación de ARN extraído.

Para la cuantificación y estimación de la calidad del ARN obtenido utilizamos la determinación por nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras. Para ello, se determinaron las absorbancias a 260, 280 y 230 nm de todas las muestras extraídas en el equipo NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro es capaz de realizar medidas precisas con cantidades de muestra muy pequeñas, del orden de 0,5 µl Para estimar la concentración de ARN se utilizan las medidas de absorbancia a 260 nm. A la vez, el equipo proporciona información sobre la pureza del ARN, mediante los ratios de absorbancia a 260/280nm y 260/230 nm que deben oscilar entre 1,65 – 2 y 2 – 2,2 respectivamente para considerar una muestra como pura.

3.4. Transcripción Inversa.

La transcripción inversa es una reacción en la que a partir del ARN de la muestra, es capaz de sintetizar las moléculas de ADN complementario (ADNc) gracias a la enzima transcriptasa reversa.

En este caso se, la reacción se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN total para un volumen final de reacción de 20 µl, utilizando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Life Technologies) que usa hexámeros al azar y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se calcula el volumen de muestra que será necesario para que la reacción se lleve a cabo con 1 µg de ARN inicial. y se prepara una mezcla de reacción según se detalla en la tabla 3 El volumen de Master Mix necesario para una reacción es 6,8 µl.

Tabla 3. Componentes de la Master Mix para la reacción de retrotranscripción por caso

Reactivo	Volumen (μ l)
10X RT Buffer	2
25X dNTPsMix (100 mM)	0,8
10X RandomPrimers	2
RNaseInhibitor	1
MultiScribe Reverse Transcriptase	1

La retrotranscripción se realizó en un termociclador 7900 HT Fast Time PCR System® (Life Technologies) estableciendo el siguiente programa de temperaturas que figura en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de temperaturas para la transcripción inversa

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

Una vez realizada la retrotranscripción, se realiza una dilución 1:4 en agua libre de RNasas del producto final de reacción por muestra y se almacenan a -20°C hasta su uso.

3.5. PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).

La RTqPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite la cuantificación relativa de la secuencia diana a la vez que tiene lugar la amplificación. Es una técnica potente, sensible y que permite analizar oligonucleótidos de distinta naturaleza. Existen varios tipos de sondas comerciales, pero las que se han usado en este estudio son las sondas TaqMan (Life Technologies). Las sondas TaqMan son oligonucleótidos lineales de secuencia complementaria a una secuencia central del oligonucleótido diana. El tipo de sonda empleada se basa en el fenómeno de FRET y en la actividad 5' – 3' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa. Si la sonda se mantiene íntegra, cuando se excite el fluoróforo a una longitud de onda determinada, la molécula *Quencher* (extremo 3') absorberá la energía y la señal de

fluorescencia captada por el receptor será mínima. En el momento en el que la sonda pierde su integridad estructural debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, se libera la molécula *Quencher* y ya no se da el fenómeno FRET, lo que implica un aumento en la señal de fluorescencia (Figura 24).

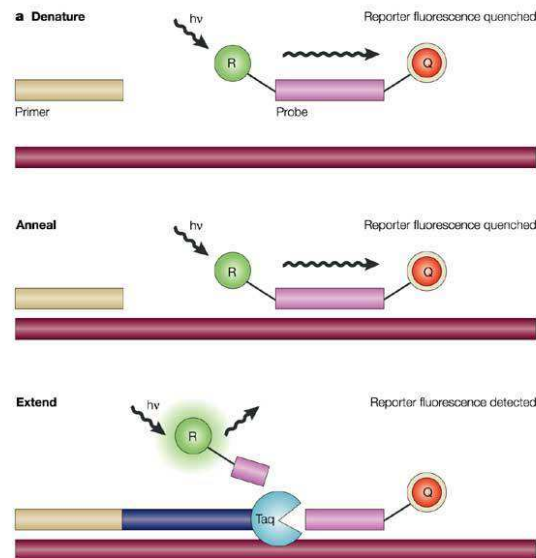


Figura 24. Proceso de amplificación y emisión de señal mediante el uso de sondas TaqMan.(Koch 2004)

Después de un número determinado de ciclos de amplificación, la señal de fluorescencia producida superará a la señal de ruido de fondo (o **línea base**) correspondiente a la señal atribuible al conjunto de moléculas de sonda que presentan el fluoróforo unido a la molécula Quencher. De tal manera que al número de ciclos a la que esta señal es significativa se conoce como ciclo *Threshold* (Ct). El **Threshold** se corresponde con el umbral que se escoge de manera arbitraria para discriminar las señales reales de la variabilidad de la línea base. De manera que una señal de fluorescencia superior al umbral establecido será considerada como una señal real (Figura 25).

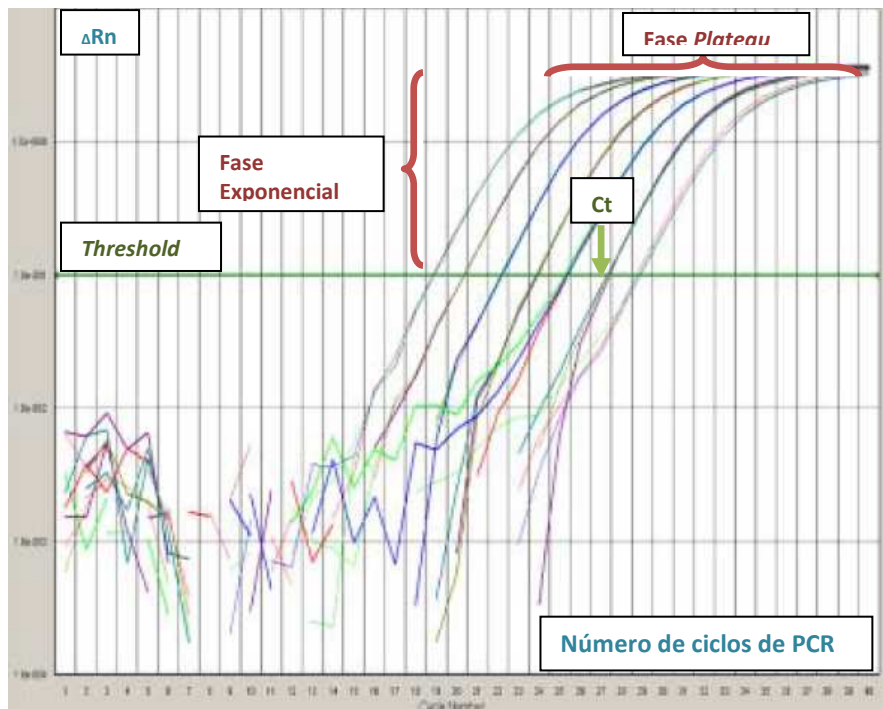


Figura 25. Esquema básico de amplificación RT-qPCR. Adaptada de (Taron et al. 2004)

El **valor Ct** es el que se empleará para determinar la cantidad relativa de cada gen, ya que el valor Ct está relacionado con la cantidad de moléculas diana presentes en cada muestra. La presencia de mayor cantidad de ADNc molde al inicio de la reacción se asocia a un menor valor Ct ya que son necesarios un menor número de ciclos de PCR para que la señal de fluorescencia supere el *Threshold*. El valor Ct se alcanza en la fase exponencial de amplificación. Cuando los componentes de la reacción sean limitantes, no se generará producto de amplificación exponencialmente y se alcanza la **fase de plateau**. En este sentido, el valor Ct proporciona una medida más fiable y reproducible que una medición del producto acumulado al final de la reacción, ya que durante la fase exponencial no se presenta ningún factor limitante.

En este estudio la RTqPCR ha sido la técnica de elección para evaluar la expresión diferencial de varios genes ya que permite la amplificación y cuantificación del ADNc de los mismos en la muestra empleando como medida el valor Ct, que dota de fiabilidad y reproducibilidad a los datos. Además esta técnica consigue minimizar tanto el riesgo de falsos negativos, por su fiabilidad, así como el riesgo de falsos positivos ya que, trabajando en condiciones adecuadas, las probabilidades de contaminación son bajas.

Se amplificaron 17 genes diana (Tabla 5) utilizando sondas de hidrólisis prediseñadas *TaqMan Gene Expression Assay* (Life Technologies). Como controles endógenos se usaron los genes de referencia *GUSB*, *ACTB* y *CDKN1B*. Esta combinación de genes de referencia se eligió en

función del resultado obtenido después de analizar aproximadamente un 30% de las muestras mediante el software GeNorm. En la normalización posterior, realizada mediante el método Pfaffl (Pfaffl & Pfaffl 2001), el factor de normalización para tejido normal y para tejido tumoral se calculó a partir de la media geométrica de los tres genes de referencia.

Tabla 5. Sondas TaqMan Gene Expression Assay utilizadas en el estudio

Gen	Tamaño amplicón (pb)	Código
<i>ACTB</i>	171	Hs99999903_m1
<i>GUSB</i>	71	Hs01558067_m1
<i>CDKN1B</i>	71	Hs00153277_m1
<i>EPCAM1</i>	64	Hs00158980_m1
<i>ALDH1A1</i>	61	Hs00946916_m1
<i>ALCAM</i>	70	Hs00233455_m1
<i>ABCG2</i>	83	Hs01053790_m1
<i>NOTCH1</i>	80	Hs01062014_m1
<i>HEY1</i>	82	Hs01114113_m1
<i>NOTCH3</i>	81	Hs01128541_m1
<i>CCND1</i>	57	Hs00765553_m1
<i>MYC</i>	107	Hs00153408_m1
<i>FZD7</i>	70	Hs_00275833_s1
<i>DKK1</i>	68	Hs00183740_m1
<i>WNT1</i>	108	Hs01011247_m1
<i>WNT5A</i>	61	Hs00998437_m1
<i>SMO</i>	54	Hs01090242_m1
<i>PTCH1</i>	72	Hs00181117_m1
<i>SHH</i>	70	Hs00179843_m1
<i>GLI1</i>	83	Hs01110766_m1

Las sondas descritas pertenecen a ensayos _m1 y _s1. En los ensayos _m1 la sonda se extiende por una unión exón-exón de los genes asociados y no se detecta ADN genómico. En el caso de los ensayos _s1, tanto ambos cebadores como la sonda se encuentran en una región exónica.

Previamente a analizar la expresión de los 17 genes estudiados en las muestras pareadas de tejido sano y normal de la cohorte de pacientes, se calcularon las **eficiencias de estos genes**. La eficiencia de un gen es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de ADNc en cada ciclo de reacción (Bustin&Nolan, 2004). Para calcular la eficiencia del gen cada gen, se realizaron 5 diluciones seriadas de una muestra de ADNc de referencia (*Human Reference cDNA*, Clontech) y se llevó a cabo la amplificación de cada gen mediante RT-qPCR. Cabe

destacar que de cada dilución se realizaron 3 réplicas. Además, en todos los casos se incluyó un control negativo (NTC). Con los valores de Ct de estas diluciones se construye una curva, de la cual se debe obtener la pendiente. Aplicando la siguiente relación, $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$, obtuvimos directamente el valor de la eficiencia de amplificación para cada gen analizado.

Todas las reacciones de RTqPCR del estudio se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos, con un volumen final de reacción de 5 µl por pocillo (4 µl de Master Mix (Tabla 6) y 1 µl de muestra).

Tabla 6. Componentes de la Master Mix para la amplificación RT-qPCR por caso

Reactivo	Volumen (µl)
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)[®](Life Technologies)	2,5
TaqMan Gene Expression Assay(Life Technologies)	0,25
Agua libre de RNasas	1,25

El reactivo *TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)* (Life Technologies) contiene la enzima AmpliTaq Gold DNA[®] polimerasa, dNTPs, buffer y AmpErase UNG[®], una enzima uracil N-glicosilasa que evita la reamplificación de productos previamente amplificados.

Una vez calculadas las eficiencias de los genes, se procedió a analizar la expresión de los mismos en las muestras de la cohorte de 178 pacientes diagnosticados de CPNM.

En las reacciones de amplificación se incluyeron diferentes controles: control negativo procedente de la reacción de retrotranscripción, NTC (No Template Control) con el objetivo descartar cualquier tipo de contaminación, y como controles positivos se emplearon: ADNc humano de referencia (*Human reference cDNA*, Clontech) y ADNc de las líneas celulares H1650, H1993, A549 y PC09.

Para llevar a cabo las reacciones se utilizó el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) con el programa de temperaturas especificado en la Tabla 7.

Tabla 7. Programa de temperaturas usado en la RT-qPCR

	Fase	Tiempo	Temperatura
Pre-PCR	AmpErase UNG	2 min	50 °C
	Hot Start	10 min	95 °C
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	15 seg	95 °C
	Unión/Extensión	1 min	60 °C

3.6. Cuantificación relativa de la expresión génica.

El análisis de la expresión génica por RT-qPCR se basa en una cuantificación relativa comparando la expresión del gen diana en las muestras respecto a la expresión de los controles endógenos (*GUSB*, *ACTB* y *CDKN1B*) seleccionados debido a que son los que presentan expresión más estable en las muestras analizadas.

Cálculo de eficiencias de los genes analizados.

Se calcularon las eficiencias de los genes estudiados ya que para la aplicación del método de normalización Pfaffl (Pfaffl & Pfaffl 2001) se requiere que el gen tenga un valor de eficiencia aproximadamente de 2. A partir de los valores Ct obtenidos después de la reacción de amplificación, se calcularon las rectas de regresión para cada uno de los genes analizados.

El incremento de Ct de cada dilución, que se corresponde con la pendiente de la recta, debe de ser un valor próximo a 3, basándonos en la ecuación que permite calcular la expresión génica en función de los parámetros eficiencia (E), número de ciclos (N) y cantidad de partida (X):

$$R = X \times E^N$$

Siempre que la eficiencia sea próxima a dos (se asume E=2 en este caso), se puede obtener la siguiente expresión:

$$R = X \times 2^N \rightarrow \frac{R}{X} = 2^N;$$

$$\log\left(\frac{R}{X}\right) = N \times \log(2);$$

$$\frac{1}{\log(2)} \times \log\left(\frac{R}{x}\right) = N \rightarrow N = 3'3219 * \log\left(\frac{R}{x}\right)$$

De modo que suponiendo que en una tanda de diluciones seriadas 1, 1:10, 1:100, 1:1000, el cociente del logaritmo será menor en proporción a cada dilución y podemos calcular el logaritmo reemplazándolo por la dilución para conocer la diferencia de ciclos entre diluciones.

$$\log\left(\frac{1}{10}\right) * \frac{1}{\log(2)} = -3'3219 \rightarrow \log\left(\frac{1}{100}\right) * \frac{1}{\log(2)} = -6,6439 \rightarrow \log\left(\frac{1}{1000}\right) * \frac{1}{\log(2)} = -9'9658$$

De este modo se justifica que el retraso teórico de los Cts en una tanda de diluciones seriadas sea de 3,3219 ciclos más en cada dilución.

Teniendo en cuenta que la diferencia de ciclos de amplificación entre las diluciones, la eficiencia del gen se calcula como: $E = 10^{-1/Pendiente}$.

Cálculo de la expresión génica relativa.

El modelo matemático empleado para la cuantificación relativa de la expresión génica es el propuesto por W. Pfaffl (Pfaffl & Pfaffl 2001), que permite estimar la cantidad relativa de un gen determinado basándose en la siguiente ecuación: $Ratio = Eficiencia^{-\Delta\Delta Ct}$

Para obtener dicho ratio, en primer lugar se calcula el factor de normalización, para tejido sano y tumoral, a partir del promedio del valor Ct de los controles endógenos. El factor de normalización de tejido sano y tumoral para cada muestra será la media geométrica de los promedios del valor Ct de *GUSB*, *ACTB*, y *CDKN1B*. Esta normalización es necesaria ya que si la expresión de los controles endógenos varía es indicativo de variaciones en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc y no a cambios en la expresión. El factor de normalización, tanto para tejido sano como tumoral, se usará como la expresión génica de referencia a la hora de calcular la diferencia relativa de la expresión génica.

$$Ratio = \frac{E_{diana}^{\Delta CP_{diana} (tejido normal-tejido tumoral)}}{E_{ref}^{\Delta CP_{ref} (tejido normal-tejido tumoral)}}$$

Ecuación 1. Ratio de expresión relativa según el modelo Pfaffl. Diana: gen diana analizado. Ref: controles endógenos. E: Eficiencia del gen. ΔCP : Diferencia de expresión entre tejido sano y tumoral para el gen.

Se considerará expresión diferencial si el ratio obtenido toma valores superiores a 1.5, indicando mayor expresión del gen diana en tejido tumoral que en tejido sano, o inferiores 0.5 en el caso de que el gen diana se encuentre menos expresado en tejido tumoral que en tejido sano.

3.7. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa estadístico SPSS 15.0. El objetivo del análisis estadístico es establecer una relación entre los niveles de expresión relativa de los genes estudiados con las variables clínico-patológicas de los pacientes, así como determinar la influencia de la expresión génica en el tiempo libre de progresión (TLP), supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Se han tenido en cuenta el sexo, la edad, la histología, el estadio y clasificación TNM, el ECOG-PS y el hábito tabáquico como las variables clínico-patológicas más relevantes en la población.

Previamente a realizar los análisis estadísticos, se revisaron los datos de expresión introducidos en la base de datos y se cribaron aquellos valores anómalos. Además, el nivel de expresión de algunos de los genes estudiados en ciertas muestras se encontraba por debajo del límite de detección del equipo, por lo que fue imposible conseguir un valor medible para estos casos. Por lo tanto, como los cálculos de expresión en estos casos se consideró el valor de Ct máximo (correspondiente a la mínima expresión detectable) para el gen y se calculó el ratio de expresión relativa como se ha descrito previamente.

Se realizó un análisis de normalidad para determinar la distribución de los datos de las variables a estudio. Como test para determinar la normalidad de las variables se tomó como referencia la prueba de Kolmogorov-Smirnov puesto que el tamaño muestral es mayor de 50 casos. La significación ($p < 0,05$) de la prueba de Kolmogorov-Smirnov reveló que las variables no siguen una distribución normal. Por tanto los análisis estadísticos realizados pertenecen a la estadística no paramétrica.

La dicotomización de variables se realizó en los análisis estadísticos que así lo requerían, y en el caso de variables continuas se utilizó la mediana como valor de corte.

En primer lugar se realizó una descripción de la cohorte, incluyendo un análisis descriptivo de la expresión de los genes estudiados. Se consideró arbitrariamente que valores de mediana de expresión génica relativa mayores a 1,5 o menores a 0,5, indicaban mayor o menor expresión respectivamente, en tejido tumoral respecto a tejido sano. Se tomó la mediana como medida comparativa ya que se ve afectada en menor medida que la media por la variabilidad de los datos y aporta mayor robustez al análisis estadístico.

Se emplearon las pruebas de *Mann-Whitney* para la comparación de dos grupos independientes y la de *Kruskall Wallis* para la comparación de más de dos grupos independientes de muestras.

Las tablas de contingencia junto con el estadístico χ^2 se utilizaron para determinar la correlación (dependencia o independencia) entre dos variables cualitativas nominales. Para establecer la correlación entre dos variables en el mismo caso, o paciente, se llevó a cabo la prueba de Wilcoxon perteneciente a la estadística no paramétrica.

Por último, se realizaron los análisis de supervivencia para cada uno de los genes estudiados utilizando el análisis Kaplan-Meier y el estadístico de contraste Log-rango. Se llevaron a cabo los análisis de supervivencia teniendo en cuenta el tiempo libre de recaída (TLR), la supervivencia libre de recaída (SLR) y la supervivencia global (SG). El tiempo hasta la recaída (TLR) se conoce como el periodo comprendido entre la fecha del diagnóstico, en este caso, cirugía, y la fecha en la que se observa una recidiva de la enfermedad (local o a distancia). La supervivencia libre de recaída (SLR) comprende el mismo periodo temporal que el TLR pero tiene en cuenta tanto la recaída como el éxito. La supervivencia global (SG) abarca el periodo comprendido entre la fecha de cirugía y la fecha de éxito. En los pacientes que no habían recidivado ni fallecido, se tomó como la fecha del último seguimiento como fecha final.

En todos los análisis estadísticos realizados se ha considerado un nivel de significación estadística correspondiente a un p-valor < 0,05, a partir del cual se rechaza la hipótesis de partida y se acepta la hipótesis alternativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COHORTE.

En este estudio se han incluido 178 pacientes con CPNM en estadios operables, que fueron sometidos a resección quirúrgica en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). Las características demográficas y clínico-patológicas más relevantes de esta cohorte de pacientes se detallan en la Tabla 8. La edad media de la cohorte es de 64 años, [28 - 65 años], siendo mayoritariamente varones (86.5%). El 66.3% presentan buen estado general con un ECOG- PS= 0. En cuanto al hábito tabáquico, el 48.3% de los pacientes son fumadores activos y un 40.4% exfumadores.

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma epidermoide (47.2%), seguido del adenocarcinoma (41,6%). El tamaño tumoral en la serie está distribuido de manera equitativa entre los tumores de hasta 3.0 cm (40.4%) y 3-5 cm (35.4%), un porcentaje mayoritario de los pacientes presentaban estadio I patológico según la 7ª edición del TNM.

Tabla 8. Análisis descriptivo de la cohorte de pacientes

		N	%
Total		178	100
Edad	Mediana	65	
	Rango	28-65	
Sexo	Hombre	154	86.5
	Mujer	24	13.5
PS	0	118	66.3
	1	59	33.1
	2	1	0.6
Tabaquismo	Nunca Fumó	20	11.2
	Exfumador	72	40.4
	Fumador activo	86	48.3
Histología	Epidermoide	84	47.2
	Adenocarcinoma	74	41.6
	Otros	20	11.2
Tamaño tumoral	≤ 3.0 cm	72	40.4
	3-5 cm	63	35.4
	5-7 cm	25	14
	>7 cm	14	7.9
Infiltración ganglionar	Sí	49	27.5
	No	129	72.5
Estadio	I-A	31	17.4
	I-B	74	41.6
	II-A	8	4.5
	II-B	27	15.2
	III-A	38	21.3
Progresión	Sí	80	44.9
	No	98	55.1
Exitus	Sí	77	43.3
	No	101	56.7

4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

4.2.1. Cuantificación y valoración de la calidad del ARN.

En todos los casos se obtuvo una concentración óptima de ARN que permitió realizar los posteriores estudios de expresión. El promedio de la concentración de ARN obtenida fue 54.4 µg. Como un parámetro para valorar la pureza del ARN extraído se usaron los ratios 260/280 y 260/230 que, en un 85-90 % de las muestras obtenidas, tomaban valores que oscilaban entre 1.65 y 2, y entre 2 y 2.2, respectivamente. Por tanto, el protocolo de extracción de ARN a partir de muestras de tejido permite obtener suficiente cantidad de ARN de calidad para realizar estudios de expresión mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real.

4.2.2. Cálculo de eficiencias y linealidad.

Para obtener el valor de la eficiencia de amplificación de cada gen, se representaron gráficamente los valores de Ct obtenidos para cada dilución y se obtuvo la ecuación de la recta de regresión.

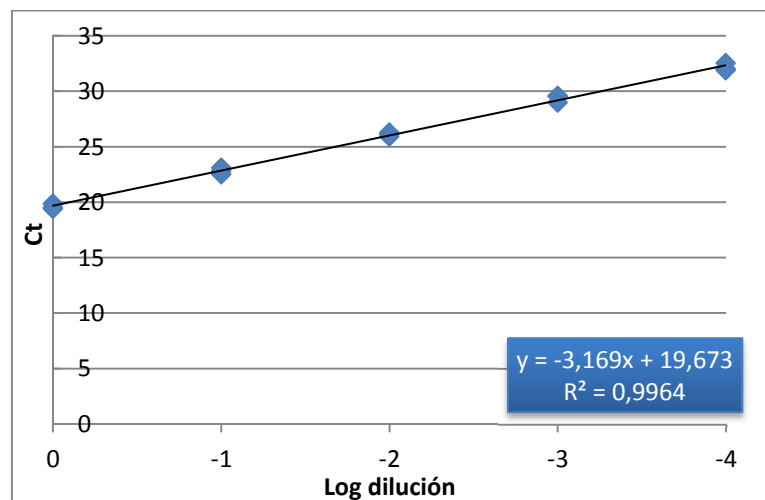


Figura 26. Ejemplo de representación de la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *ALDH1A1*. Para el cálculo de la eficiencia se deben representar los valores de Ct de cada dilución, en función del logaritmo de la concentración.

Se tuvo en cuenta la dispersión de las réplicas de cada dilución, además de la pendiente de la recta de regresión, que debía de oscilar en valores próximos a 3, ya que se corresponde con el incremento del valor Ct de cada dilución. A partir de la pendiente de la recta de regresión se obtiene el valor de la eficiencia, a partir de la fórmula .

Los valores de eficiencia de los genes analizados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Eficiencias de los genes analizados.

GEN	EFICIENCIA	EFICIENCIA (%)
<i>EPCAM1</i>	2,00	100
<i>ABCG2</i>	1,97	98,70
<i>ALDH1</i>	2,00	100
<i>ALCAM (CD166)</i>	1,96	97,80
<i>HEY1</i>	1,85	92,40
<i>NOTCH1</i>	1,81	90,70
<i>NOTCH3</i>	1,97	98,80
<i>MYC</i>	1,85	92,40
<i>CCND1</i>	1,78	82,30
<i>DKK1</i>	2,00	100
<i>FZD7</i>	1,82	91,10
<i>WNT5A</i>	1,86	93,21
<i>PTCH1</i>	1,86	92,99
<i>SHH</i>	1,97	98,66
<i>SMO</i>	2,00	100
<i>GLI1</i>	1,83	91,57

4.2.3. Cuantificación relativa de la expresión génica.

El análisis de la expresión génica relativa se realizó en 178 parejas de muestras de tejido tumoral y normal de pacientes con CPNM. Los genes seleccionados están implicados en tres rutas de señalización: Notch, Wnt y Hedgehog. Un total de 17 genes diana (Tabla 9) y 3 genes controles endógenos pudieron ser amplificados mediante los cebadores y sondas seleccionados.

Tabla 10. Genes analizados agrupados por rutas de señalización.

Vía Notch	Vía Wnt	Vía Hedgehog	Otros	Genes de referencia
<i>NOTCH1</i>	<i>CCND1</i>	<i>SMO</i>	<i>EPCAM1</i>	<i>ACTB</i>
<i>HEY1</i>	<i>MYC</i>	<i>PTCH1</i>	<i>ALDH1A1</i>	<i>GUSB</i>
<i>NOTCH3</i>	<i>FZD7</i>	<i>SHH</i>	<i>ALCAM</i>	<i>CDKN1B</i>
<i>CCND1</i>	<i>DKK1</i>	<i>GLI1</i>	<i>ABCG2</i>	
<i>MYC</i>	<i>WNT1</i>			
	<i>WNT5A</i>			

(Liang et al. 2015; Fujiwara et al. 2014; Stewart 2013; Schnell et al. 2013; Sullivan et al. 2011; Osanyingbemi-Obidi et al. 2011; Maitah et al. 2011).



Figura 27. Mediana de expresión génica relativa de los genes estudiados.

Las medianas de expresión génica relativa de los genes analizados se encuentran representadas en la Figura 27. En general, hemos encontrado algunos genes como *ABCG2* (x0.23) y *SHH* (x0.34) infraexpresados en tejido tumoral mientras que genes como *NOTCH3* (x2.24) y *SMO* (x2.59) se encuentran sobreexpresados. El resto de genes analizados muestran medianas de expresión génica relativa entre 0.5 y 2.0 por lo que su expresión no parece variar significativamente en tumores con respecto al parénquima pulmonar normal, de estos genes solamente *EPCAM1* (x1.51) y *WNT5A*(x1.53)parecen estar un poco más expresados en tejido tumoral. Si centramos el análisis por vías de señalización, en el caso de los **genes de la vía Notch**, solamente *NOTCH3* está sobreexpresado mientras que *NOTCH1* (x0.59) y *HEY1* (x1.08) no muestran diferencias en cuanto a la expresión entre tejido tumoral y sano (Figura 27).

En tumores de mama, existen datos que indican que la vía Notch podría estar activada intrínsecamente en tumores primarios y en metástasis (Bolós et al. 2013; Guo et al. 2011; Stylianou et al. 2006) (Tao et al. 2011; Sethi et al. 2011). En modelos *in vitro* de cáncer de mama, se ha observado un aumento en la expresión de los factores de transcripción *HEY1* y *HES1* así como del oncogen *MYC*, la activación de estos genes está inducida por la translocación al núcleo celular del dominio intracelular de Notch (NICD) y su unión al factor de transcripción CSL provoca una activación del mismo, lo que induce la expresión de estos genes (Bolós et al. 2013). No obstante, en el trabajo de Bolós y colaboradores, al igual que en este estudio, no se observan cambios en la expresión de *NOTCH1*; por lo que otro receptor sería el responsable de la activación de la ruta. El receptor que podría activar la ruta Notch podría ser el receptor *NOTCH3*, ya que se ha demostrado que junto a *NOTCH1*, es el que tiene mayores implicaciones en cáncer (Konishi et al. 2010). Una activación de la ruta Notch mediada por el receptor *NOTCH3* estaría en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo ya que hemos observado una sobreexpresión (x2.24) de este receptor en tejido tumoral.

Los resultados de expresión relativa obtenidos para los **genes de la vía Wnt**, mostraron niveles ligeramente elevados de *WNT5A* en tejido tumoral (x1.53), mientras que *MYC* (x0.74) y *CCND1* (x0.64) se encontraron menos expresados (Figura 27). Estos resultados indicarían que existe una activación de la ruta no canónica por parte de *WNT5A* que conduce a una inhibición de la vía canónica encargada de activar *MYC* y *CCND1* (Figura 28) (Kikuchi et al. 2012). Además, la mayor expresión de la ruta no canónica se ve reforzada por estudios previos que describen asociaciones entre la expresión de *WNT5A* y el tabaquismo (Whang et al. 2013), siendo la población de fumadores y exfumadores la que conforma el 88.7% (Tabla 8) de la cohorte estudiada. Por tanto, la mayor expresión de *WNT5A* que indica una mayor predominancia de la ruta no canónica está justificada en la cohorte ya que en nuestra serie está formada en su mayoría por pacientes fumadores. Respecto al receptor *FZD7* (x1.14) y al inhibidor *DKK1* (x0.98) no se encontraron resultados concluyentes en cuánto a diferencias de expresión en el tumor respecto a tejido sano ya que las medianas de expresión génica relativa toman valores cercanos a 1. En este trabajo también se analizó la expresión del gen *WNT1* aunque no se pudieron valorar los resultados ya que los niveles de amplificación de *WNT1* con la sonda empleada no llegaban al límite de detección del equipo. Con el objetivo de poder cuantificar la expresión de este gen, en futuros trabajos, se debería contemplar la opción de escoger cebadores distintos, ya que los usados para este trabajo pueden no ser los adecuados. Además en otros trabajos valoran la expresión de *WNT1* mediante la técnica de inmunohistoquímica por lo que, a pesar de ser una técnica menos sensible que la RT-qPCR, podría usarse en combinación con ésta con el objetivo de poder estudiar la expresión de *WNT1* en tejido sano y tumoral (Lv et al. 2010; Huang et al. 2008; Nakashima et al. 2008).

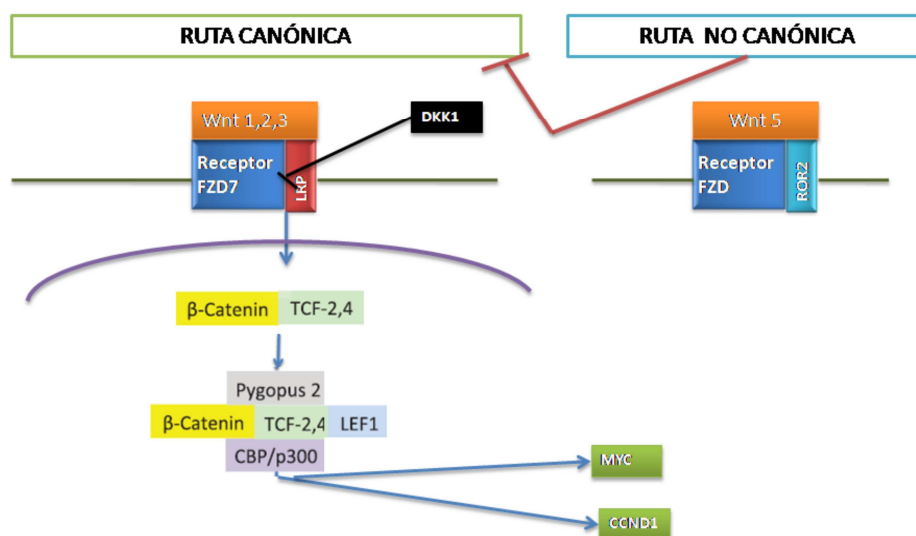


Figura 28. Esquema de la interrelación de las rutas canónica y no canónica de la vía Wnt.

En cuanto a la **vía Hedgehog**, encontramos que el ligando SHH (x0.34) se encuentra infraexpresado en muestras tumorales, sin embargo *GLI1*(x1.75) y *SMO*(x2.59) presentan niveles de expresión aumentados en tumor respecto a tejido normal (Figura 27), datos que apoyarían la posible implicación de esta vía en el mantenimiento de la población CSC en CPNM, al ser *GLI1* el principal factor de transcripción que controla la vía (Clement et al. 2007). Sin embargo, cabría esperar una mayor expresión del resto de genes analizados, especialmente del ligando activador de la vía *SHH* (Varjosalo& Taipale 2008). Existen estudios que muestran activación de la vía Hedgehog independiente de *SHH*, relacionando esta activación con posibles alteraciones en *PTCH1* o *SMO*, o con la sobreexpresión de *GLI1*(Lauth et al. 2007; Chi et al. 2006). En este sentido, nuestros datos son concordantes: infraexpresión de *SHH* y sobreexpresión de *SMO* y *GLI1*, lo que parece indicar una activación de la vía con independencia de ligando aunque serían necesarios más estudios para la confirmación de estos resultados.

Finalmente, el análisis descriptivo de la expresión génica relativa puso de manifiesto una mayor expresión de *EPCAM1* (x1.51), característica propia de un fenotipo de CSC, en tejido tumoral (Figura 27)(Schnell et al. 2013). Encontrar una mayor expresión en tejido tumoral indica que en el tumor hay una población de células con propiedades de célula madre por lo que *EPCAM1* podría usarse como biomarcador que indique la presencia de CSC en el tumor. En nuestro grupo, hemos caracterizado una población de células iniciadoras de tumores EPCAM+ obtenidas a partir de CPNM de pacientes resecaados, que son capaces de generar tumores en modelos *in vivo* (Martinez-Romero et al. 2014).

Los genes *ABCG2*, *ALDH1A1* y *ALCAM* presentan niveles de expresión menores en tejido tumoral respecto a tejido sano (0.23X, 0.65X y 0.55X, respectivamente) (Figura 27), a pesar de que se esperaría al menos, una mayor expresión de *ABCG2* y *ALDH1A1* en tejido tumoral ya que están reconocidos como marcadores propios de un fenotipo CSC. *ABCG2*, *ALDH1A1* son genes característicos de un fenotipo CSC ya que están relacionados con algunas de las propiedades más distintivas de este tipo de células como la detoxificación y resistencia a fármacos (Zakaria et al. 2015; Sullivan et al. 2011; Robey et al. 2007). Los resultados obtenidos en este sentido podrían deberse a una presencia muy baja de CSC en el tejido tumoral debido a que la mayoría de nuestra cohorte presenta CPNM en estadios tempranos como se indica en la Tabla 8 (59% estadio I, 17.7% estadio II y 36.5% estadio III) o a que la población de CSC en la muestra de tumor analizada no fuese lo suficientemente representativa. No obstante la expresión de *ALCAM* no ha resultado ser un marcador distintivo de la población de CSC en

cáncer de pulmón ya que mayor expresión de ALCAM se asocia a tumores poco agresivos, pequeños y sin infiltración ganglionar, por tanto nuestros resultados están de acuerdo con las evidencias previas (Tachezy et al. 2014).

En resumen, de acuerdo a nuestros datos, en pacientes con CPNM en estadios resecable, parece existir una activación de las rutas Notch, Wnt y Hedgehog, ya que se observa mayor expresión de algunos de los genes como *NOTCH3*, *WNT5A*, *SMO* y *GLI1* en tejido tumoral, lo que podría poner de manifiesto un papel activo de estas rutas en este tipo de tumores, que estarían sustentando el mantenimiento de la población de CSC en el tumor (Shojima et al. 2015; Whang et al. 2013; Hassan et al. 2013; Bolós et al. 2013; Guo et al. 2011; Maitah et al. 2011; Clement et al. 2007; Lauth et al. 2007),

Como limitación a nuestro abordaje se ha de tener en cuenta que los genes estudiados son específicos de CSC y la población objeto de estudio presenta CPNM en estadios tempranos (59% de los casos presentan estadio I y un 19.7% presentan estadio II, frente a un 21.3% que presentan estadio III) por lo que la población de CSC en el tumor puede no ser representativa. Además por la heterogeneidad de tipos celulares presentes en el tumor, es posible que, en la muestra aislada, la población de CSC no estuviese representada. Por tanto, para futuros estudios y para validar los resultados obtenidos sería necesario analizar muestras enriquecidas en CSC. Una posibilidad para conseguir una mayor representación de la población de CSC en las muestras sería llevar a cabo una selección por citometría de flujo asociada a *sorting* con marcadores de células madre. De esta manera, con una mayor representación de las células madre tumorales, se podría llegar a detectar mayor expresión de los genes analizados en este estudio.

4.2.4. Análisis de correlaciones entre genes.

Las correlaciones entre las variables analíticas se realizaron considerando las mismas como variables continuas y tras su dicotomización (tomando como valor de corte la mediana de cada gen) se utilizó el estadístico chi cuadrado (χ^2) y se tomaron como significativamente estadísticos los valores de $p \leq 0.05$. En general, los resultados evidenciaron una relación entre los genes implicados en cada ruta, así como una relación positiva entre la expresión de los marcadores característicos de un fenotipo CSC.

En la Tabla 11 se describen de manera detallada los resultados de las correlaciones entre los genes de la **vía Notch**.

Tabla 11. Correlaciones significativas observadas para los genes implicados en la vía de señalización Notch.

Correlación entre la expresión de los genes	p (*)
<i>NOTCH1-HEY1</i>	p<0.001
<i>NOTCH1-NOTCH3</i>	p=0.027
<i>NOTCH1-MYC</i>	p<0.001
<i>NOTCH1-CCND1</i>	p=0.003
<i>NOTCH3-MYC</i>	p=0.056
<i>NOTCH3-CCND1</i>	p=0.017

(*) estadístico chi cuadrado

Con el objetivo de determinar si los niveles de expresión de *NOTCH1*, *NOTCH3* y *HEY1* se seguían correlacionando en las muestras de un mismo paciente, se realizaron análisis de muestras pareadas (prueba de Wilcoxon). Los resultados obtenidos siguen mostrando correlaciones entre *NOTCH1* y *HEY1* (p<0,001) y entre *NOTCH1* y *NOTCH3* (p<0,001). Estos resultados podrían indicar que hay una relación entre la expresión de uno de los receptores de la ruta (*NOTCH1*) y un factor de transcripción (*HEY1*) encargado de activar a un grupo de genes efectores de la ruta. Paralelamente, también se observa la relación entre la expresión de dos de los receptores (*NOTCH1* provocaría y *NOTCH3*) (Figura 29). Por lo tanto, los resultados obtenidos están en consonancia con otros estudios anteriores en los que también se observa esta relación entre los genes implicados en la vía NOTCH (Fan et al. 2006).

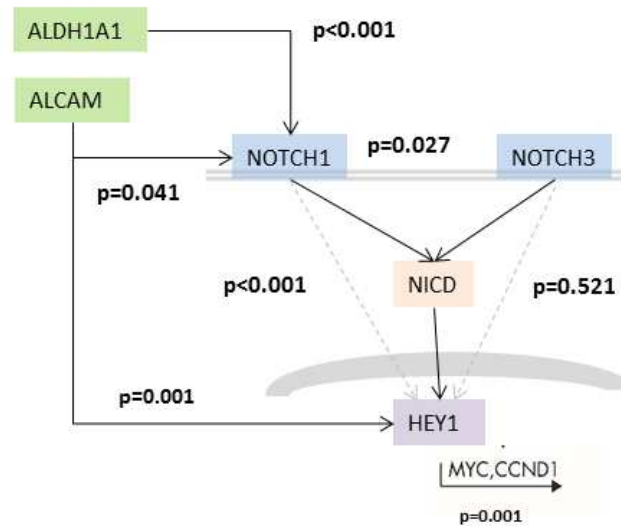


Figura 29. Representación esquemática de los genes analizados de la vía Notch y algunas de las correlaciones significativas obtenidas. La activación de la ruta Notch lleva asociada una escisión del dominio intracelular de los receptores (NICD). NICD se trasloca al núcleo donde se une a factores de transcripción como *HEY1* que inducirán la expresión de genes diana de la ruta como *MYC* o *CCND1*.

No sólo se observan correlaciones positivas entre los genes implicados en la ruta Notch, sino que los análisis también muestran una correlación entre la expresión de determinados marcadores característicos de un fenotipo CSC y la expresión de los genes implicados en la vía de señalización NOTCH (Tabla 12). Estos resultados se suman a datos previos que postulan una implicación de la ruta Notch en el mantenimiento de poblaciones celulares que exhiben marcadores característicos de CSC como *ALCAM*, *ABCG2* o *ALDH1A1*(Figura 29) (Hassan et al. 2013; Yu et al. 2012).

Tabla 12. Correlaciones significativas observadas entre los genes pertenecientes a la vía Notch y algunos de los marcadores característicos de un fenotipo CSC.

Correlación entre la expresión de los genes	p (*)
<i>NOTCH1-ABCG2</i>	p<0.001
<i>NOTCH1-ALDH1A1</i>	p<0.001
<i>NOTCH1-ALCAM</i>	p=0.041
<i>HEY1-ALCAM</i>	p=0.010

(*) estadístico chi cuadrado

Los resultados obtenidos para las correlaciones de los genes cuantificados de la **vía Wnt** fueron más dispares (

Tabla 13). Se observó una correlación positiva entre *MYC* y *CCND1* ($p = 0.001$), al igual que se observaba en el caso de la ruta de señalización Notch, un resultado esperado, ya que ambos son productos transcritos gracias a la activación de las vías Notch (Figura 29) y Wnt (Figura 30), y por lo tanto, deberían co-expresarse (Xu et al. 2011).

Tabla 13. Correlaciones estadísticamente significativas entre los genes de la ruta Wnt ().

Correlación entre la expresión de los genes	p(*)
<i>MYC-CCND1</i>	$p=0.001$
<i>FZD7-WNT5A</i>	$p<0.001$
<i>DKK1-FZD7</i>	$p<0.001$

(*) Estadístico chi cuadrado

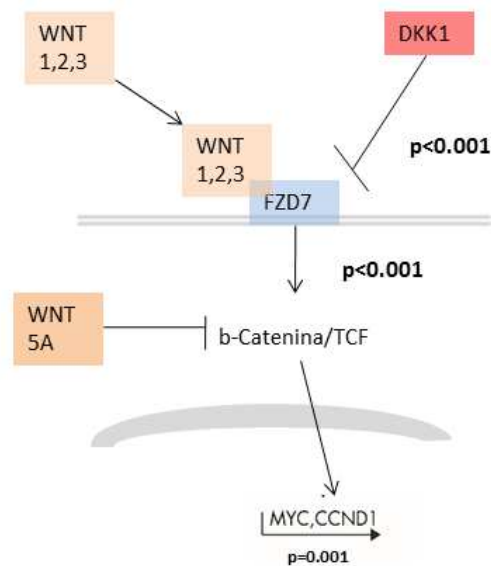


Figura 30. Representación esquemática de los genes analizados de la vía WNT y algunas de las correlaciones significativas obtenidas. La unión del ligando WNT (1, 2 o 3) al receptor FZD7 desencadena la activación de la ruta canónica de la vía de señalización Wnt que conducirá a la formación de un complejo de varias proteínas como la β -catenina que se traslocará al núcleo e inducirá la expresión de los genes diana de la ruta como *MYC* o *CCND1* entre otros. DKK1 es un inhibidor de la ruta canónica. Si el ligando WNT5A se une al receptor FZD7, tendrá lugar la activación de la ruta canónica de Wnt.

Las correlaciones significativas encontradas entre genes de la **vía Hedgehog**, se describen en la Tabla 14. Nuestros análisis demuestran una correlación entre *PTCH1* y *SHH* ($p < 0.001$), entre *PTCH1* y *SMO* ($p < 0.001$), y entre *SMO* con *GLI1* y *CCND1* ($p < 0.001$ y $p = 0.007$ respectivamente). La prueba de Wilcoxon (muestras pareadas) también encuentra correlaciones significativas entre *PTCH1* y *SHH* ($p = 0,001$), *PTCH1* y *SMO* ($p < 0,001$) y entre *SMO* y *GLI1* ($p = 0,022$), en concordancia con estudios anteriores que describen la relación entre los distintos componentes de la vía Hedgehog y la implicación de la misma con el mantenimiento de las poblaciones de CSC en CPNM (Duman-Scheel et al, 2012; Gialmanidis et al. 2009; Song et al. 2011).

Tabla 14. Correlaciones significativas entre los genes de la ruta Hedgehog.

Correlación entre la expresión de los genes	P (*)
<i>PTCH1-SHH</i>	$p < 0.001$
<i>PTCH1-GLI1</i>	$p < 0.001$
<i>PTCH1-SMO</i>	$p < 0.001$
<i>SHH-GLI1</i>	$p < 0.001$
<i>SHH-SMO</i>	$p = 0.001$
<i>GLI1-SMO</i>	$p < 0.001$
<i>SMO-CCND1</i>	$p = 0.007$

(*) estadístico chi cuadrado

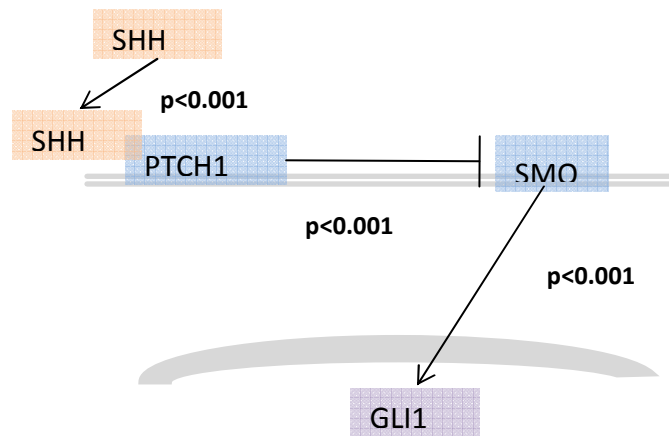


Figura 31. Representación esquemática de los genes analizados de la vía WNT y algunas de las correlaciones significativas obtenidas. En ausencia de ligando, PTCH1 ejerce un efecto represor sobre SMO y previene la activación de la ruta. Cuando el ligando SHH se une al receptor PTCH1, el efecto represor sobre SMO desaparece y se observa una activación de la vía de señalización. GLI1 es un factor de transcripción implicado en esta ruta.

Además de analizar las correlaciones entre los diferentes genes de una misma ruta, se decidió analizar las correlaciones entre las tres rutas ya que, tanto Notch, Wnt como Hedgehog parecen estar activas en la población de CSC.

Las tres vías de señalización están relacionadas a través de la proteína GSK3 β . Por una parte, la activación de la vía canónica de Wnt está mediada por la inactivación de la proteína GSK3 β , una kinasa encargada de fosforilar la β -catenina con el objetivo de estimular su degradación por el proteosoma celular. Este mismo proceso ocurre en la vía Hedgehog, donde GSK3 β forma un complejo que se encarga de fosforilar GLI1/2 para su posterior degradación. Cuando se da la expresión de *WNT-1,2,3*, la acción inhibitoria de GSK3 β desaparece, por lo que no podrá ejercer su función de inhibición en la ruta Wnt ni en la ruta Hedgehog. Algo similar ocurre con la activación de la vía Notch, donde el fragmento intracelular NICD estimulará la activación de *AKT*, y este a su vez inhibirá al complejo en el que participa GSK3 β (Figura 32). De esta forma, la activación de Notch y Wnt, podría estar favoreciendo a su vez la activación de la ruta Hedgehog a través del bloqueo del efecto represor de GSK3 β . De forma parecida, la activación de la transcripción de *CCND1* a través de Wnt y Hedgehog favorece la activación de Notch, al actuar este como un antagonista de *NUMB*, uno de los principales inhibidores de la ruta.

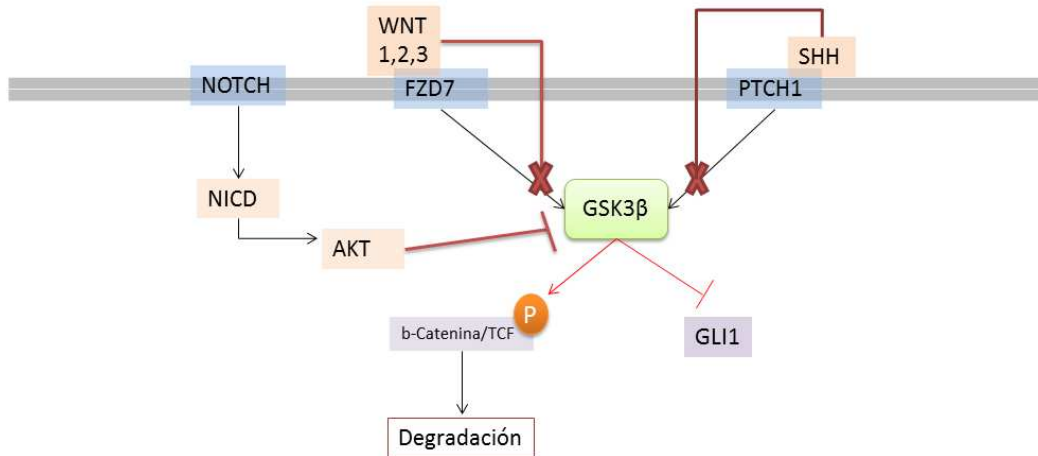


Figura 32. Implicación de GSK3 β en las vías de señalización Notch, Wnt y Hedgehog. En ausencia de ligandos WNT 1, 2, 3 y/o SHH, GSK3 β impide la activación de las vías Wnt y Hedgehog mediante la fosforilación del complejo de β -catenina y la inhibición del factor de transcripción GLI1, respectivamente. Cuando se da la unión de estos ligando a sus receptores, el efecto represor de GSK3 β sobre las rutas. Paralelamente la activación de la vía Notch, vía AKT, ejerce un efecto inhibitorio sobre GSK3 β .

Este marcador no ha sido analizado en nuestra serie pero sería muy interesante analizar su correlación con otros marcadores de nuestra cohorte. No obstante, el efecto inhibitorio de NICD sobre GSK3 β se podría justificar en nuestra serie por la sobreexpresión de *NOTCH3* (x2.24), de manera que su escisión por la acción de la γ -secretasa liberaría el dominio intracelular de Notch (NICD) (Figura 32) aunque son necesarios más estudios para validar estos resultados. Además el efecto inhibitorio sobre GSK3 β se observa en la mayor expresión de *GLI1* (x1.75) ya que en el caso de que GSK3 β no estuviese reprimido, se esperaría una menor expresión de *GLI1*. Además el análisis de correlaciones entre los distintos genes reveló una relación positiva entre *NOTCH3* y *GLI1* ($p=0.003$) de manera que se podría justificar el mayor nivel de expresión de *GLI1* gracias a que una sobreexpresión de *NOTCH3* y por consiguiente, la liberación de NICD que ejerce un efecto represor sobre GSK3 β .

Siguiendo con la interrelación observada en las tres rutas, cabe destacar que los oncogenes *MYC* y *CCND1* son genes diana de las mismas, de manera que la expresión de ambos genes es atribuible a la activación de las tres rutas en conjunto y no sólo al estado activo de una de ellas. En este sentido, es importante poner de manifiesto el papel represor que presenta *CCND1* sobre NUMB (inhibidor de la ruta Notch). Si se tiene en cuenta que la expresión de *CCND1* se ve reforzada por el estado activo de las vías Wnt y Hedgehog, cabe esperar un mayor estado activo de la ruta NOTCH ya que *CCND1* estaría eliminando el efecto inhibitorio de NUMB.

Por último, las correlaciones de los diferentes marcadores de CSC analizados reflejaron relaciones positivas entre todos ellos (Tabla 15), lo que refuerza la idea de que todos ellos son marcadores característicos de CSC. Evidencias previas han puesto de manifiesto que *ALDH1A1*, así como *ABCG2* son dos de los principales responsables de la resistencia a fármacos que presentan las CSC, ya que, como se ha explicado en este trabajo, tienen funciones implicadas en la detoxificación y la expulsión de los fármacos al exterior celular (Alamgeer et al. 2013; Robey et al. 2007). Además *EPCAM1* es una molécula de adhesión cuya expresión parece ser característica de la población CSC (Patriarca et al. 2012). No obstante, en CPNM no se ha logrado establecer una relación clara entre la expresión de *ALCAM* en CSC y existen resultados contradictorios en función del tipo de tumor que se estudie (Fujiwara et al. 2014; Ni et al. 2013; Lugli et al. 2010). Por tanto en vista a estos resultados y teniendo en cuenta la relación entre la expresión de estos marcadores se podría intentar identificar una firma molecular que identificara la población de CSC.

Tabla 15. Correlaciones estadísticamente significativas entre los genes analizados como marcadores propios de CSC.

Correlación entre la expresión de los genes	p
<i>EPCAM1-ABCG2</i>	p=0.003
<i>EPCAM1-ALDH1A1</i>	p=0.02
<i>EPCAM1-ALCAM</i>	p=0.005
<i>ABCG2-ALDH1A1</i>	p<0.001
<i>ABCG2-ALCAM</i>	p=0.018
<i>ALCAM-ALDH1A1</i>	p<0.001

(*) estadístico chi cuadrado

4.2.5. Correlación entre los niveles de expresión génica con las variables clínico-patológicas.

Con el objetivo de establecer una relación entre los niveles de expresión de los genes estudiados y las variables clínico-patológicas de los pacientes se realizaron los tests de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Este tipo de análisis requiere la expresión relativa como variable continua y una variable de agrupación (variable clínico-patológica) discreta de dos (Mann-Whitney) o más categorías (Kruskal-Wallis). Las variables demográficas y clínico-patológicas que se analizaron fueron: sexo (hombres y mujeres), edad (tomando como valor de corte los 65 años), hábito tabáquico, tipo histológico, estadio patológico, estado funcional, infiltración ganglionar y tamaño tumoral. En la Tabla 16 se resumen los resultados más significativos de las correlaciones realizadas con variables las clínico-patológicas.

No se encontraron diferencias de expresión estadísticamente significativas de ninguno de los genes estudiados en función de la edad, estado funcional o infiltración ganglionar. Por el contrario, los resultados muestran que hay diferencias de expresión en función del sexo. Mientras que en varones se encuentra una mayor expresión de los genes *HEY1* ($p=0.037$) y *FZD* ($p=0.032$), en la población de mujeres se observa una mayor expresión de *SHH* ($p=0.011$). Se debe de tener en cuenta que, debido a la epidemiología de la enfermedad, la población de mujeres es muy inferior a la de varones, por lo que estos resultados deberían validarse en una serie más amplia.

Además se observa una mayor expresión de *NOTCH3* ($p=0.013$) en fumadores mientras que *ABCG2* ($p=0.015$) y *SHH* ($p=0.002$) están más expresados en la población no fumadora. A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta que nuestra cohorte se caracteriza por tener un gran porcentaje de pacientes fumadores (48.3% de fumadores activos y 40.4% de ex fumadores), se entiende que, considerando la cohorte en su totalidad, encontremos sobreexpresión de *NOTCH3* (x2.24) y niveles más bajos de expresión de *ABCG2* (x0.23) y *SHH* (x0.34).

En cuanto a las diferencias de expresión génica relativa en función del tipo histológico se observa la tendencia general de las tres rutas estudiadas, a encontrar una mayor expresión en tumores de tipo epidermoide respecto a los adenocarcinomas: *ALDH1A1* ($p=0.01$), *HEY1* ($p<0.0001$), *NOTCH1* ($p<0.0001$), *FZD7* ($p<0.0001$), *WNT5A* ($p<0.0001$), *MYC* ($p<0.002$), *PTCH1* ($p<0.021$), *GLI1* ($p<0.006$) y *SMO* ($p<0.0001$), la excepción es el gen *EPCAM1* ($p<0.038$) que se

encuentra más expresado en adenocarcinomas (

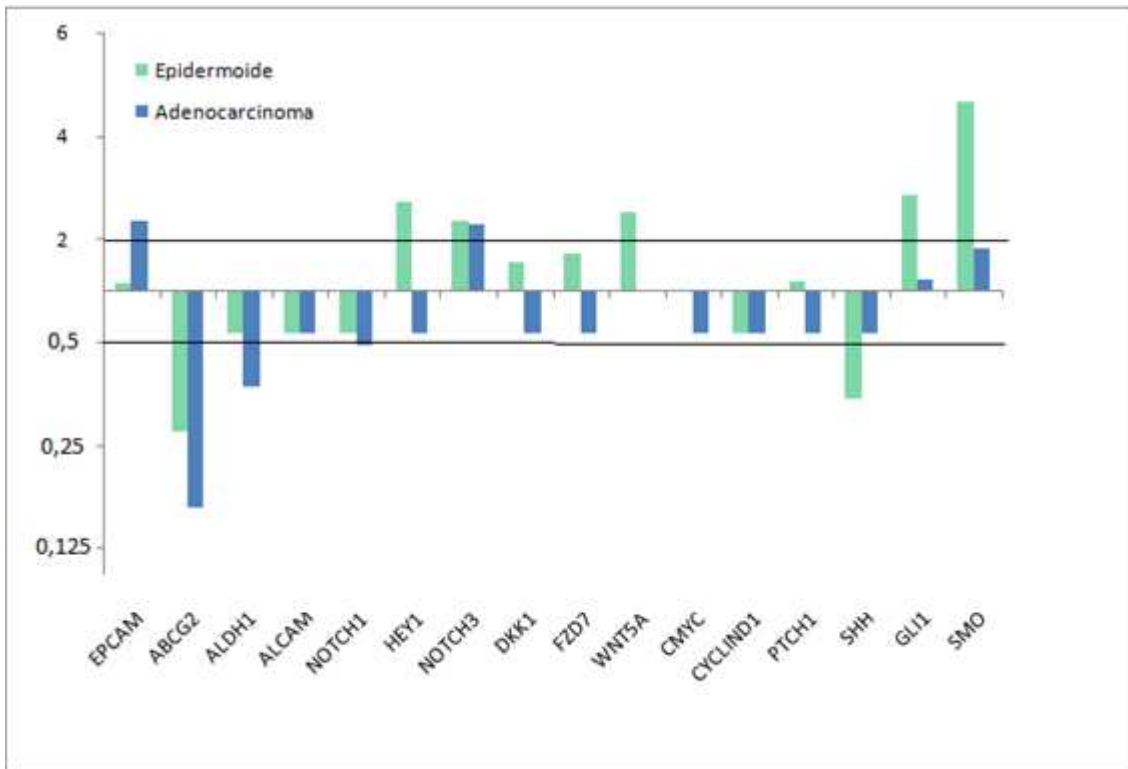


Figura 33).

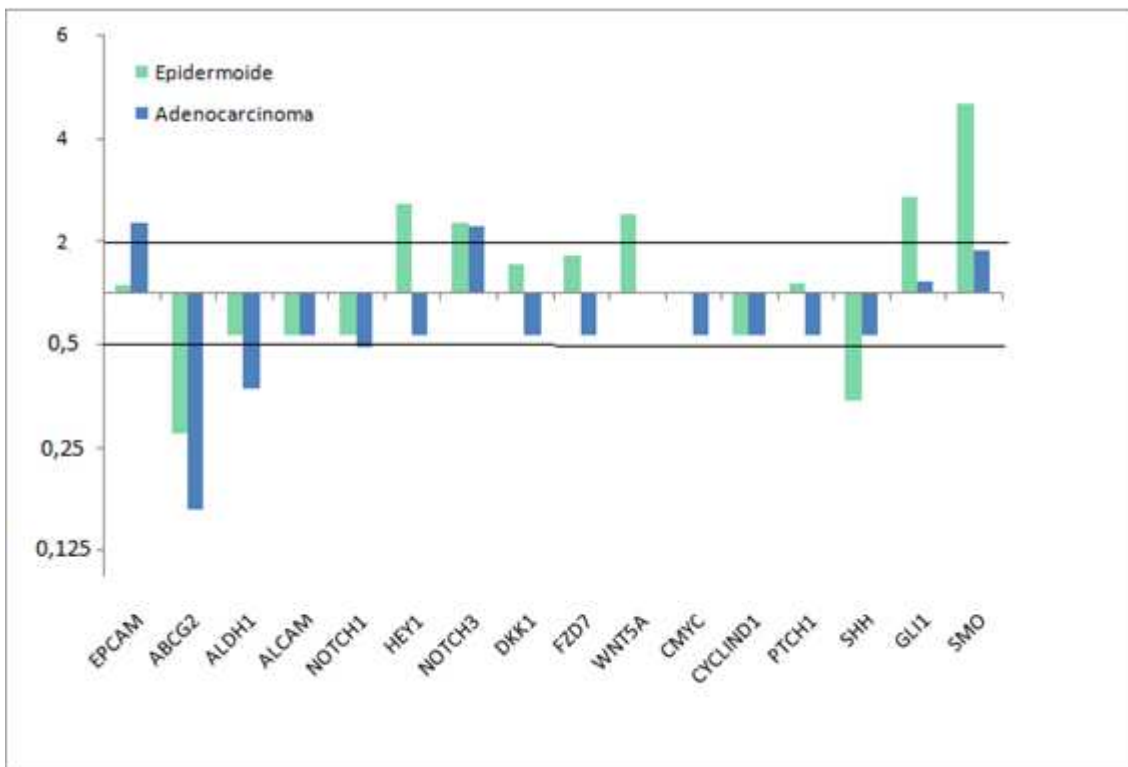


Figura 33. Expresión génica según los tipos histológicos mayoritarios. La serie azul representa a la histología adenocarcinoma y la serie verde representa a la histología epidermoide.

En los genes de la vía Wnt: *DKK1*, *FZD7*, *WNT5A* y *MYC* mostraron una mayor expresión en histología epidermoide que en adenocarcinomas, pero es el gen *WNT5A* el que mostraba mayores valores de sobreexpresión (x2.509). Este resultado se encuentra en consonancia con los obtenidos por otros trabajos que también observaron la expresión diferencial en los dos tipos histológicos (Yao et al. 2014; Huang et al. 2005).

En la vía Hedgehog, *SMO* y *GLI1* se presentaban sobreexpresados en histología epidermoide respecto a adenocarcinoma, al igual que *PTCH1* aunque con niveles más moderados que no llegan a la sobreexpresión; mientras que no se encontró ninguna correlación entre el tipo histológico y la expresión de *SHH*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gialmanidis et al, que encontraron las mismas correlaciones para los cuatro genes estudiados (Gialmanidis et al. 2009).

Tabla 16. Diferencias en la expresión génica relativa según las variables clínico-patológicas.

			N	Mediana	Sig
SEXO	<i>HEY1</i>	Mujeres	20	0.538	0.037*
		Hombres	138	1.135	
	<i>SHH</i>	Mujeres	20	0.949	0.011*
		Hombres	134	0.218	
	<i>FZD7</i>	Mujeres	21	0.504	0.032*
		Hombres	144	1.288	
HÁBITO TABÁQUICO	<i>ABCG2</i>	Nunca fumó	19	0.622	0.015*
		Fumadores o ex	147	0.202	
	<i>NOTCH3</i>	Nunca fumó	19	1.294	0.013*
		Fumadores o ex	141	2.425	
	<i>SHH</i>	Nunca fumó	17	1.317	0.002*
		Fumadores o ex	137	0.300	
TIPO HISTOLÓGICO	<i>EPCAM1</i>	Epidermoide	80	1.144	0.038*
		Adenocarcinoma	67	2.342	
		Otros	14	1.618	
	<i>ALDH1A1</i>	Epidermoide	79	0.783	0.010*
		Adenocarcinoma	67	0.328	
		Otros	14	0.392	
	<i>NOTCH1</i>	Epidermoide	78	0.949	0.0001*
		Adenocarcinoma	68	0.446	
		Otros	14	0.491	
	<i>HEY1</i>	Epidermoide	73	2.720	0.0001*
		Adenocarcinoma	66	0.526	
		Otros	14	1.045	
<i>DKK1</i>	Epidermoide	80	1.536	0.029*	

		Adenocarcinoma	66	0.519	
		Otros	19	0.705	
	FZD7	Epidermoide	78	1.7033	0.0001*
		Adenocarcinoma	68	0.726	
		Otros	19	0.682	
	WNT5A	Epidermoide	80	2.509	0.0001*
		Adenocarcinoma	67	1.008	
		Otros	19	0.819	
	MYC	Epidermoide	79	1.009	0.002*
		Adenocarcinoma	66	0.499	
		Otros	18	0.461	
	PTCH1	Epidermoide	78	1.160	0.021*
		Adenocarcinoma	66	0.606	
		Otros	14	0.867	
	GLI1	Epidermoide	77	2.856	0.006*
		Adenocarcinoma	61	1.197	
		Otros	13	0.868	
	SMO	Epidermoide	79	4.668	0.0001*
		Adenocarcinoma	65	1.794	
		Otros	14	1.036	
TAMAÑO	EPCAM1	<3.5	78	2.387	0.032*
		>3.5	84	1.353	
ESTADIO	SHH	I-II	120	0.464	0.011*
		III	34	0.185	

4.2.6. Análisis del valor pronóstico del estudio de expresión de genes implicados en el mantenimiento y proliferación de CSC.

El análisis del valor pronóstico de los genes analizados en el presente trabajo y que están implicados en el comportamiento biológico de la población CSC se realizó teniendo en cuenta el tiempo libre de recaída (TLR), la supervivencia libre de recaída (SLR) y la supervivencia global (SG) empleando el método Kaplan-Meier y el estadístico de contraste Log-rango. Se aceptaron como estadísticamente significativos todos aquellos resultados cuya $p \leq 0.05$. Para los análisis de supervivencia, se utilizó la mediana como valor de corte en todas las variable de expresión génica (ver valores en Figura 27). De esta manera, el grupo “Alto” hace referencia al grupo de pacientes cuyas muestras tienen valores de expresión superiores a la mediana de la población, mientras que fueron codificados como “Bajo” el grupo de muestras cuyos valores de expresión eran iguales o inferiores a la mediana de expresión génica relativa del gen analizado.

En primer lugar se analizó la supervivencia, considerando TLR, SLR y SG, de los 178 pacientes que componen la cohorte en función de las variables clínico-patológicas sexo, tamaño tumoral, infiltración, tipo histológico y estadio para determinar el comportamiento general de la serie (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis univariante de supervivencia para las variables clínico-patológicas

Variables	TLR		SLR		SG	
	Mediana de tiempo libre de recaída(meses)	p	Mediana de supervivencia libre de recaída (meses)	p	Mediana de supervivencia global (meses)	p
Sexo						
Mujeres	NA	0.303	NA	0.141	NA	0.104
Hombres	44.3		37.8		73.9	
Tamaño						
<3.5	56.8	0.032 *	55.4	0.052 *	NA	0.121
>3.5	31.5		26.7		51.9	
Infiltración						
No	NA	0.007 *	49.3	0.014 *	82.6	0.079
Si	26.2		26.2		42.9	
Histología						
Epidermoide	48.3	0.466	45.8	0.678	73.9	0.628
Adenocarcinoma	37.9		37.7		81.2	
Otros	18.2		18.2		32.3	
Fumadores						
No	NA	0.757	NA	0.297	NA	0.069
Ex	35.3		26.7		53.3	
Si	45.8		45.8		NA	

Estadios						
I	49.3	0.129	45.8	0.142	81.2	0.163
II	83.6		66.9		NA	
III	26.2		24		46.7	
Progresión						
Si			NA	<0.001*	NA	<0.001*
No			14.9		25.0	
Quimioterapia						
No	83.6	0.048*	49.3	0.051*	NA	0.199
Si	24		24		66.9	

*p<0.05. p: p-valor. TLR (tiempo libre de progresión). SLR (supervivencia libre de progresión). SG: supervivencia global. NA: mediana no alcanzada.

Se encontraron diferencias en cuanto a los tiempos a la recaída en función del tamaño tumoral o la infiltración linfática. Como era de esperar, los pacientes con tumores de menor tamaño o los que no tenían infiltración ganglionar, tenían un mejor pronóstico con mayores tiempos hasta la recaída (Figura 34), datos que están en consonancia con lo descrito en la bibliografía en relación a que pacientes con estadios tempranos presentan un mejor pronóstico, poniendo de manifiesto la importancia de un diagnóstico precoz (Jantus-lewintre et al. 2012; Groot & Munden 2012).

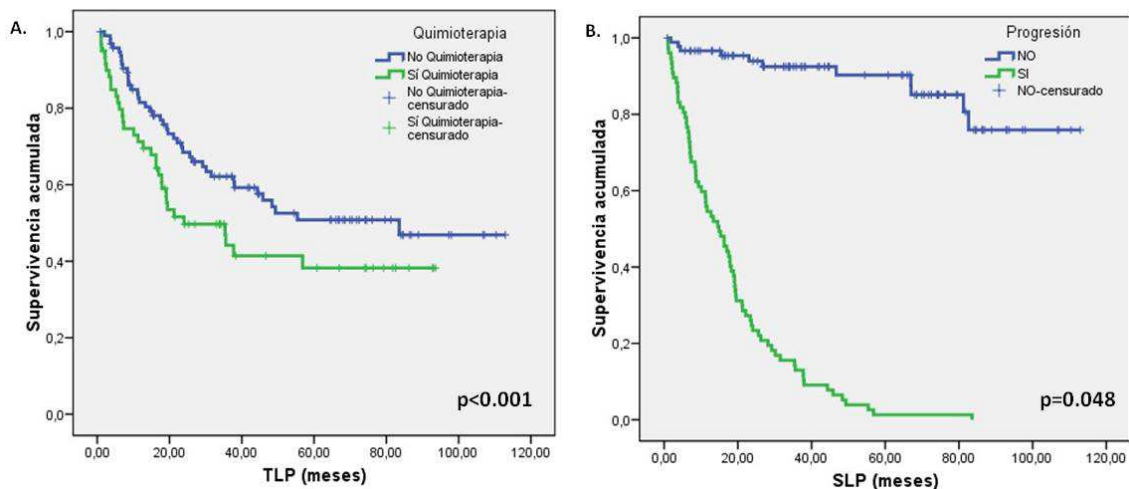


Figura 34. Curvas de Kaplan-Meier para el tamaño tumoral e infiltración linfática. A. TLR (Tiempo libre de recaída) para el tamaño tumoral. La serie azul representa al subgrupo de pacientes con un tamaño tumoral ≤ 3.5 cm y la serie verde representa al subgrupo de pacientes que presentan un tamaño tumoral > 3.5 cm. B. TLR (Tiempo libre de recaída) para la infiltración linfática. La serie azul representa al subgrupo que no presenta afectación linfática y la serie verde representa al subgrupo de pacientes que sí presenta infiltración linfática.

Por otro lado, los pacientes que no recibieron tratamiento con citotóxicos tras la resección quirúrgica presentan mayor TLR ($p=0.048$). Esta tendencia se observa también si analizamos la SLR ($p=0.051$) y SG ($p=0.199$), aunque no se llega al nivel de significación estadística. Esto está en estrecha relación con el estadio tumoral, ya que sólo llevan tratamiento adyuvante (post-cirugía) los pacientes con estadios más avanzados, y por lo tanto, los de peor pronóstico en nuestra cohorte.

Paralelamente se realizaron los análisis de supervivencia en función de los niveles de expresión de los genes estudiados, los cuales se encuentran resumidos en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis univariante de supervivencia (Kaplan-Meier) según los niveles de expresión génica de los genes estudiados

Variables	TLR		SLR		SG	
	Mediana de progresión (meses)	P	Mediana de supervivencia (meses)	P	Mediana de supervivencia (meses)	P
EPCAM						
Bajo	49.3	0.871	37.8	0.464	67	0.297
Alto	48.3		48.3		NA	
ABCG2						
Bajo	37.7	0.521	26.7	0.199	66.9	0.235
Alto	56.8		55.4		NA	
ALDH1						
Bajo	35.6	0.546	31.5	0.18	67	0.373
Alto	56.8		55.4		NA	
ALCAM						
Bajo	37.7	0.454	31.5	0.244	51.9	0.187
Alto	55.4		49.3		81.2	
NOTCH1						
Bajo	NA	0.917	31.5	0.372	67	0.404
Alto	49.3		49.3		NA	
HEY1						
Bajo	83.6	0.137	49.3	0.355	82.6	0.081
Alto	35.6		35.4		53.3	
NOTCH3						
Bajo	44.3	0.466	37.7	0.404	67	0.158
Alto	NA		56.8		NA	
DKK1						
Bajo	83.6	0.882	24	0.4	81.2	0.375
Alto	48.3		46.7		NA	
FZD7						
Bajo	NA	0.425	46.7	0.965	81.2	0.68
Alto	35.6		35.4		73.9	
WNT5A						
Bajo	83.6	0.571	49.3	0.816	81.2	0.708
Alto	37.7		35.6		73.9	
CMYC						
Bajo	25.6	0.298	23.7	0.051	46.7	0.021*
Alto	56.8		55.4		NA	

CCND1						
Bajo	44.3	0.547	35.4	0.293	67	0.179
Alto	55.4		55.4		NA	
PTCH1						
Bajo	37.7	0.505	31.5	0.133	49.6	0.161
Alto	56.8		56.8		NA	
SHH						
Bajo	83.6	0.589	44.3	0.957	81.2	0.996
Alto	49.3		48.3		73.9	
GLI1						
Bajo	83.6	0.663	46.7	0.65	81.2	0.595
Alto	48.3		48.3		NA	
SMO						
Bajo	83.6	0.349	46.7	0.824	81.2	0.953
Alto	44.3		44.3		73.9	

* $p < 0.05$. p: p-valor. TLR (tiempo libre de recaída). SLR (supervivencia libre de recaída). SG: supervivencia global. NA: mediana no alcanzada.

En este sentido, en el análisis de supervivencia para los genes de la ruta Notch, se observa una tendencia que asocia una mayor expresión de *HEY1* con un tiempo a la recaída más corto ($p=0.13$) y a una menor supervivencia global ($p=0.081$) (Figura 35).

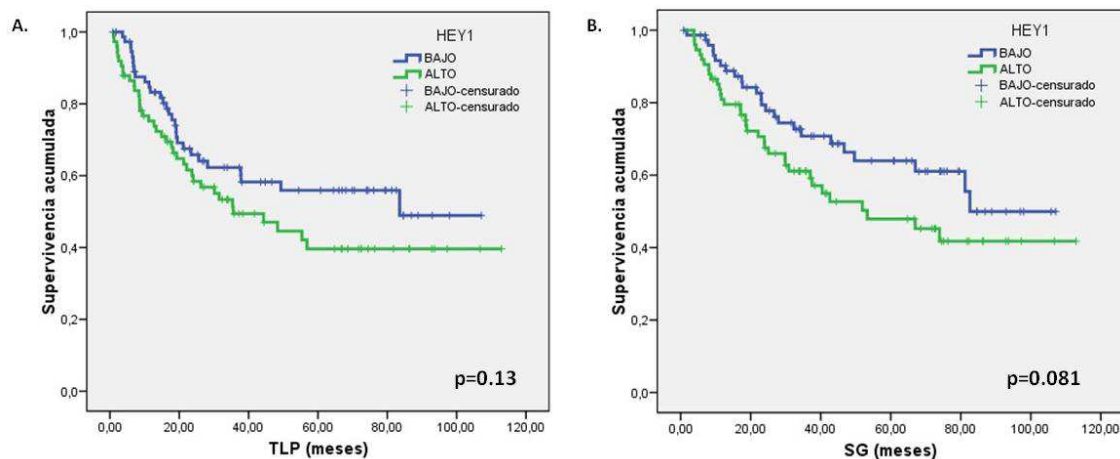


Figura 35. Curvas Kaplan Meier para HEY1. A. TLR (tiempo libre de recaída) para HEY1. B. SG (supervivencia global). La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores o iguales a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana.

En vista de estos resultados observados y con el fin de evaluar mejor el pronóstico de los pacientes, se decidió abordar la combinación de marcadores en función de los perfiles de expresión de los genes analizados y teniendo en cuenta las interacciones que existen entre ellos. Para este tipo de análisis, se realizaron combinaciones de dos marcadores, definiendo como grupo de mal pronóstico en cada caso aquel caracterizado por combinar el patrón de expresión de mal pronóstico para los dos marcadores combinados. Cada una de estas combinaciones fue comparada con las otras posibles opciones de combinación de los dos

marcadores en cuestión. En primer lugar, dada la fuerte correlación observada entre *NOTCH1* con *HEY1* ($p < 0.001$), se realizó el estudio combinando estos dos marcadores. Niveles altos de *NOTCH1*, *HEY1* o ambos, seleccionaban a un grupo de pacientes con menor tiempo hasta la recaída ($p = 0.092$) (Figura 36). Este resultado apoyaría el hecho de que la activación de la vía Notch (mediada por *HEY1*) activa a un conjunto de genes efectores relacionados con la proliferación y el mantenimiento de la población de CSC que condicionarían un peor curso clínico del paciente.

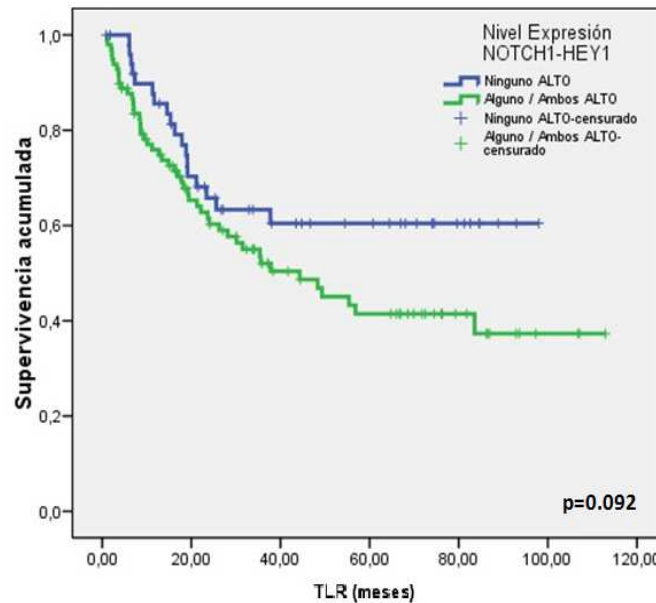


Figura 36. Curva Kaplan Meier para la expresión combinada de *NOTCH1-HEY1* en la población general. TLR (tiempo libre de recaída) para la expresión de *NOTCH1-HEY1*. La serie azul engloba a aquellos pacientes que no presentan ninguno de los genes expresados por encima de las medianas y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan alguno o ambos genes expresados por encima de las medianas.

En relación a la vía Wnt, ninguno de los genes estudiados mostró relación con el pronóstico, con excepción del gen *MYC*, que reveló una mejora de la SG ($p = 0.021$) y de la SLR ($p = 0.051$) cuando la expresión del gen está por encima de la mediana (Figura 37). A pesar de lo paradójico que puede considerarse este resultado debido a la naturaleza oncogénica de *MYC*, se debe tener en cuenta el valor de expresión del gen (X0.74) en la cohorte, por tanto cabe destacar que los valores altos no se refieren a sobreexpresión en este caso, sino a una expresión por encima de la mediana del gen. Por lo tanto, es posible que estos resultados estén más influenciados por los valores de infraexpresión de *MYC*, que en determinadas condiciones pueda disminuir la supervivencia.

No obstante cabe destacar que en la mayoría de los casos de CPNM en estadios resecables, se ha observado sobreexpresión de la vía Wnt (Stewart 2013), principalmente por *WNT1*, por

tanto sería interesante para futuros trabajos poder evaluar la expresión de *WNT1* y correlacionarla con el pronóstico de los pacientes. En este trabajo se pretendía evaluar la expresión de *WNT1* conjuntamente con los demás genes implicados en la ruta Wnt, sin embargo no fue posible cuantificar por la técnica de RTqPCR la expresión relativa de *WNT1* en la cohorte de pacientes. Por tanto sería conveniente plantear un nuevo diseño experimental y usar otro tipo de sonda ya que un problema del diseño de la sonda puede ser la causa de que no se haya conseguido la amplificación de *WNT1*. Para futuros estudios se podría considerar la elección de otro tipo de sonda de hidrólisis que amplifique otra zona del gen. Por otro lado, también se podría evaluar a nivel de proteína la expresión de *WNT1* mediante la inmunohistoquímica utilizada en otros trabajos, aunque se ha de tener en cuenta que estos resultados no tendrán valor cuantitativo y la técnica de la RTqPCR sigue siendo más sensible (Lv et al. 2010; Huang et al. 2008; Nakashima et al. 2008).

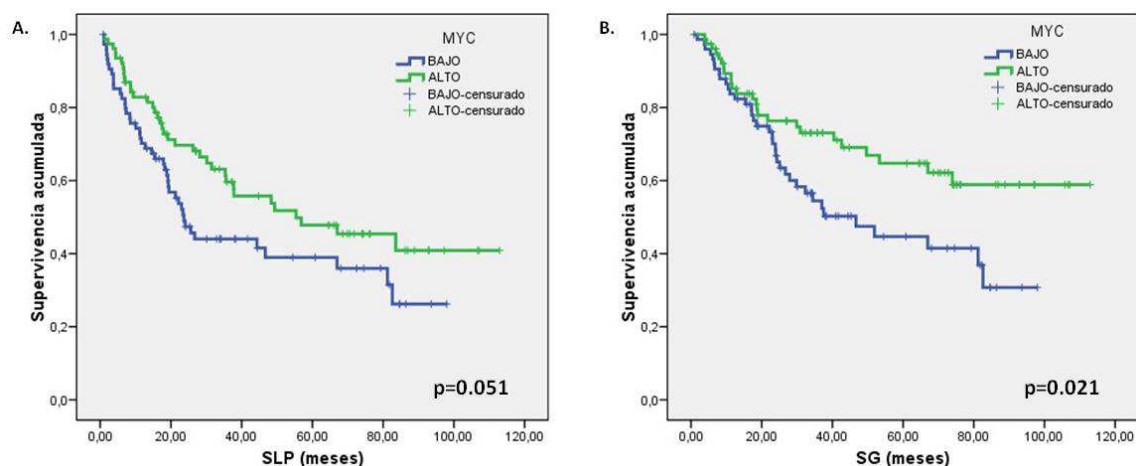


Figura 37. Curvas Kaplan Meier para MYC en la población general. A. SLR (supervivencia libre de recaída) para MYC. B. SG (supervivencia global) para MYC. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana.

En los genes estudiados pertenecientes a la vía Hedgehog, ninguno de ellos mostró una asociación con el pronóstico en nuestra cohorte de pacientes.

Sin embargo, existen datos en relación a la sobreexpresión de genes de estas rutas de señalización y el valor pronóstico de varios de los genes de dichas vías (Evangelista et al. 2006; Maitah et al. 2011; Shih & Wang 2007; Sjölund et al. 2005). En este sentido, hay estudios previos que proponen a NOTCH1 o DKK1 como marcadores de pronóstico en estadios II y IIIA de CPNM, estos trabajos han analizado la expresión de estos posibles biomarcadores con una técnica distinta a la elegida para este trabajo, la inmunohistoquímica en muestras de tejido parafinadas. Cabe destacar los pacientes incluidos en estos estudios presentaban estadios

resecables de la enfermedad y no recibieron tratamiento neoadyuvante, al igual que en nuestra cohorte de estudio (Donnem et al. 2010; Sheng et al. 2009). Después de un tratamiento quimioterápico puede que haya un enriquecimiento en CSC, ya que este tipo de células son resistentes a los agentes citotóxicos. Por tanto, dado que la cohorte de estudio no ha recibido ningún tratamiento neoadyuvante pudiera ser que en las muestras aisladas a partir de tejido tumoral no se consiguiera suficiente representación de este tipo de células.

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR SUBGRUPOS:

A) HISTOLOGIA

Dado que nuestra cohorte incluye pacientes con diferentes histologías y dadas las diferencias significativas observadas en relación a la expresión de los genes estudiados entre la histología epidermoide y adenocarcinoma (Tabla 16), se procedió a realizar un subanálisis dentro de cada grupo histológico.

En la (Tabla 19) se muestran los resultados de los análisis de supervivencia (univariantes) para los genes de la vía Notch .

Tabla 19. Análisis de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Notch y marcadores de CSC.

	Variables	TLR		SLR		SG	
		Mediana de tiempo libre de recaída (meses)	P	Mediana de supervivencia libre de recaída (meses)	P	Mediana de supervivencia (meses)	P
EPIDERMOIDES	EPCAM						
	Bajo	44.3	0.650	44.3	0.388	67	0.222
	Alto	55.4		55.4		NA	
	ABCG2						
	Bajo	44.3	0.570	44.3	0.444	53.3	0.318
	Alto	56.8		56.8		NA	
	ALDH1						
	Bajo	35.4	0.622	35.4	0.376	46.7	0.346
	Alto	56.8		55.4		NA	
	ALCAM						
	Bajo	35.6	0.253	35.6	0.188	51.9	0.185
	Alto	56.8		55.4		NA	
	NOTCH1						
	Bajo	NA	0.777	46.7	0.966	67	0.539
	Alto	55.4		48.3		NA	
	HEY1						
Bajo	NA	0.13	83.6	0.224	NA	0.185	
Alto	44.3		44.3		53.3		

ADENOCARCINOMA	NOTCH3						
	Bajo	44.3	0.440	44.3	0.220	51.9	0.109
	Alto	56.8		56.8		NA	
	EPCAM						
	Bajo	49.3	0.592	37.8	0.973	81.2	0.738
	Alto	37.7		21.3		NA	
	ABCG2						
	Bajo	37.7	0.665	33.4	0.785	66.9	0.584
	Alto	49.3		49.3		NA	
	ALDH1						
	Bajo	37.8	0.959	23.4	0.790	81.2	0.892
	Alto	49.3		49.3		66.9	
	ALCAM						
	Bajo	37.8	0.648	37.7	0.872	NA	0.647
	Alto	23.4		23.4		81.2	
	NOTCH1						
	Bajo	37.7	0.959	23.4	0.593	66.9	0.708
	Alto	49.3		49.3		NA	
	HEY1						
	Bajo	49.3	0.346	37.7	0.323	81.2	0.204
Alto	21.3		19.2		37.5		
NOTCH3							
Bajo	37.8	0.887	37.7	0.576	NA	0.663	
Alto	NA		26.7		66.9		

*p<0.05. p: p-valor. TLR (tiempo libre de recaída). SLR (supervivencia libre de recaída). SG: supervivencia global. NA: mediana no alcanzada.

El análisis de supervivencia por subgrupos histológicos puso de manifiesto la tendencia a la asociación de mayores niveles de HEY1 con un menor TLR ($p=0.13$) considerando a la población de histología epidermoide (Figura 38). Este comportamiento, que ya se evidenciaba en la población general (Figura 35), sugiere un papel activo de este efector de la vía Notch en CPNM. Las CSC son, en gran parte, las responsables de la recurrencia de la enfermedad (Kreso & Dick 2014; Yu et al. 2012) y por tanto los casos en los cuales se expresen en mayor medida genes implicados en rutas de señalización que favorezcan el mantenimiento de este tipo de células en el tumor, tendrán asociado un peor pronóstico en cuanto a las posibilidades de recaída que tienen estos paciente.

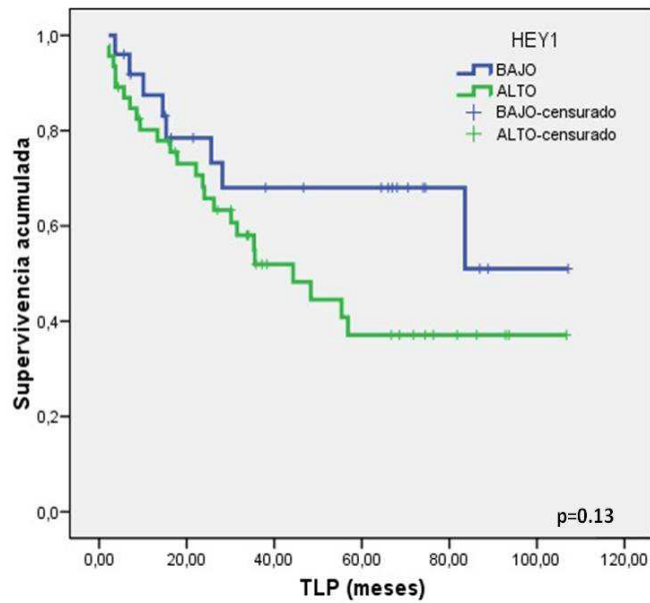


Figura 38. Curva Kaplan Meier para HEY1 en el subgrupo de pacientes con histología epidermoide. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana. TLR: tiempo libre de recaída.

A continuación se analizó también la supervivencia en función de los genes de la ruta Wnt en los subgrupos de pacientes que presentaban histología epidermoide y adenocarcinoma, de igual manera que se ha realizado previamente teniendo en cuenta los genes de la ruta Notch. En la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 20. Análisis univariante de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Wnt.

Variables	TLR		SLR		SG		
	Mediana de tiempo libre de recaída (meses)	P	Mediana de supervivencia libre de recaída (meses)	P	Mediana de supervivencia (meses)	P	
EPIDERMOIDES	DKK1						
	Bajo	83.6	0.6	35.4	0.625	NA	0.347
	Alto	48.3		48.3		79.3	
	FZD7						
	Bajo	NA	0.335	67	0.552	67	0.824
	Alto	35.6		35.6		73.9	
	WNT5A						
	Bajo	83.6	0.728	46.7	0.753	46.7	0.274
	Alto	48.3		45.8		NA	
	CMYC						
	Bajo	25.6	0.116	25.6	0.109	46.7	0.148
	Alto	83.6		67		NA	
	CCND1						
	Bajo	44.3	0.196	44.3	0.164	51.9	0.074
Alto	NA		56.8		NA		

ADENOCARCINOMAS	DKK1						
	Bajo	23.4	0.721	21.3	0.294	66.9	0.268
	Alto	49.3		37.8		NA	
	FZD7						
	Down	49.3	0.864	37.7	0.839	81.2	0.803
	Up	21.1		21.1		66.9	
	WNT5A						
	Bajo	NA	0.474	37.8	0.568	81.2	0.978
	Alto	21.3		21.1		66.9	
	CMYC						
	Bajo	NA	0.950	21.3	0.256	37.5	0.115
	Alto	49.3		49.3		NA	
CCND1							
Bajo	NA	0.130	37.8	0.388	NA	0.456	
Alto	21.1		21.1		66.9		

* $p < 0.05$. p: p-valor. TLR (tiempo libre de recaída). SLR (supervivencia libre de recaída). SG: supervivencia global. NA: mediana no alcanzada.

Teniendo en cuenta la histología epidermoide, al igual que se observaba en la población general, se observa que un aumento en los niveles de *MYC* tiende a aumentar la SG ($p=0.148$) (Figura 39), así como el TLR ($p=0.116$) y SLR ($p=0.109$), a pesar de que los resultados no llegaron al nivel de significación establecido.

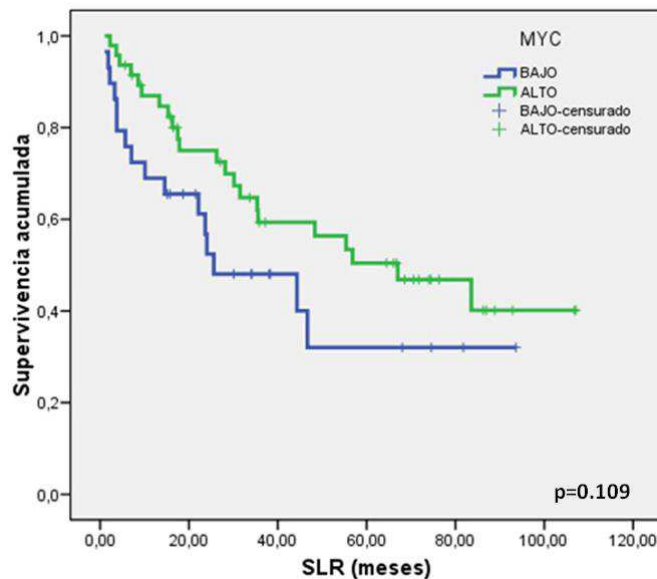


Figura 39. Curva Kaplan Meier para *MYC* en el subgrupo de pacientes con histología epidermoide. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana. SLR: Supervivencia libre de recaída.

Por su parte, *CCND1* mostró diferentes tendencias al analizar el TLR entre la histología epidermoide y adenocarcinomas (Figura 40). La mayor expresión en tumores epidermoides se relacionó con un aumento del TLR, mientras que el mismo análisis en adenocarcinomas mostraba una reducción cuando la expresión era mayor a la mediana.

Aunque algunos estudios ya habían relacionado la expresión de *CCND1*, junto con otros genes alterados como *p53*, como un marcador de pronóstico favorable en estadios tempranos de CPNM (Mishina et al. 1999), las diferencias observadas en cuanto a las diferentes histologías deberían confirmarse en una cohorte más amplia.

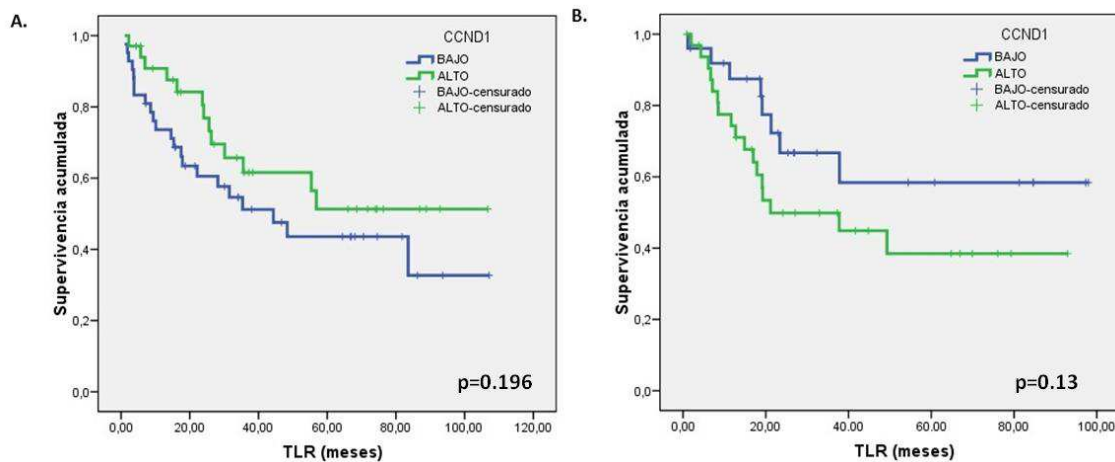


Figura 40. Curva Kaplan Meier para *CCND1* en histología epidermoide y en adenocarcinoma. Comparación del TLR (tiempo libre de recaída) entre la expresión de *CCND1* en adenocarcinomas (A) y epidermoides (B). La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana.

Finalmente se repitieron los análisis de supervivencia dividiendo a la serie en función del tipo histológico (epidermoide y adenocarcinoma) teniendo en cuenta la expresión de los genes de la ruta Hedgehog. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 21. Análisis univariante de la supervivencia en función de los niveles de expresión génica para los genes de la vía Hedgehog.

Variables	TLR		SLR		SG		
	Mediana de tiempo libre de recaída (meses)	p	Mediana de supervivencia libre de recaída (meses)	p	Mediana de supervivencia (meses)	p	
EPIDERMOIDE	<i>PTCH1</i>						
	Bajo	35.4	0.289	35.4	0.197	53.3	0.371
	Alto	56.8		55.4		NA	
	<i>SHH</i>						
Bajo	83.6	0.682	46.7	0.885	67	0.836	
Alto	55.4		55.4		NA		

	GLI1						
	Bajo	83.6	0.945	46.7	0.513	67	0.409
	Alto	55.4		55.4		NA	
	SMO						
	Bajo	35.4	0.525	35.4	0.425	46.7	0.304
	Alto	48.3		48.3		NA	
ADENOCARCINOMAS	PTCH1						
	Bajo	37.7	0.694	23.4	0.242	42.9	0.019
	Alto	NA		31.2		NA	
	SHH						
	Bajo	NA	0.584	37.7	0.95	81.2	0.868
	Alto	49.3		23.4		66.9	
	GLI1						
	Bajo	NA	0.323	49.3	0.653	66.9	0.857
	Alto	21.1		19.2		NA	
	SMO						
Bajo	NA	0.13	49.3	0.391	81.2	0.722	
Alto	19.2		19.2		37		

*p<0.05. p: p-valor. TLR (tiempo libre de recaída). SLR (supervivencia libre de recaída). SG: supervivencia global. NA: mediana no alcanzada.

Respecto a la ruta Hedgehog, se encontraron diferencias según la expresión *PTCH1* en la población de adenocarcinomas. En adenocarcinomas ya se ha descrito previamente la activación de esta ruta (Ishikawa et al. 2014).

El análisis de la SG considerando los niveles de expresión del receptor *PTCH1* reveló que niveles bajos de *PTCH1* se asociaban con una mayor SG ($p=0.019$) (Figura 41.A). Para explicar este comportamiento es necesario recordar que en ausencia de ligando SHH, el receptor *PTCH1* ejerce un efecto represor sobre *SMO*, impidiendo la activación de la ruta (Varjosalo & Taipale 2008). Cabe destacar por tanto, que en nuestra cohorte el ligando *SHH* se encuentra infraexpresado ($\times 0.34$) (Figura 27), por lo que se podría considerar que al haber poca disponibilidad del ligando SHH, habrá también menor unión del mismo a *PTCH1*. Sin embargo, serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. En ausencia de ligando, *PTCH1* se encuentra reprimiendo a *SMO*, previniendo la activación de la ruta, por tanto cabe esperar que en las condiciones de ausencia de ligando SHH, mayores niveles de expresión de *PTCH1* se asocien con una mejor SG ya que este receptor previene la activación de la ruta. Pero en los casos en los que se encuentra una baja expresión de *PTCH1* es esperable que al desaparecer en gran parte el efecto represor sobre *SMO*, se produzca una activación de la ruta Hedgehog implicada en el mantenimiento y proliferación de las CSC (Song et al. 2011; Evangelista et al. 2006), asociándose a una menor SG. Este hecho se respalda con las diferencias en cuanto a TLR que se observan según la expresión de *SMO* (Figura 41.B). En adenocarcinomas, mayores

niveles de *SMO* tienden a asociarse, aunque de manera no significativa, con un menor TLR ($p=0.130$).

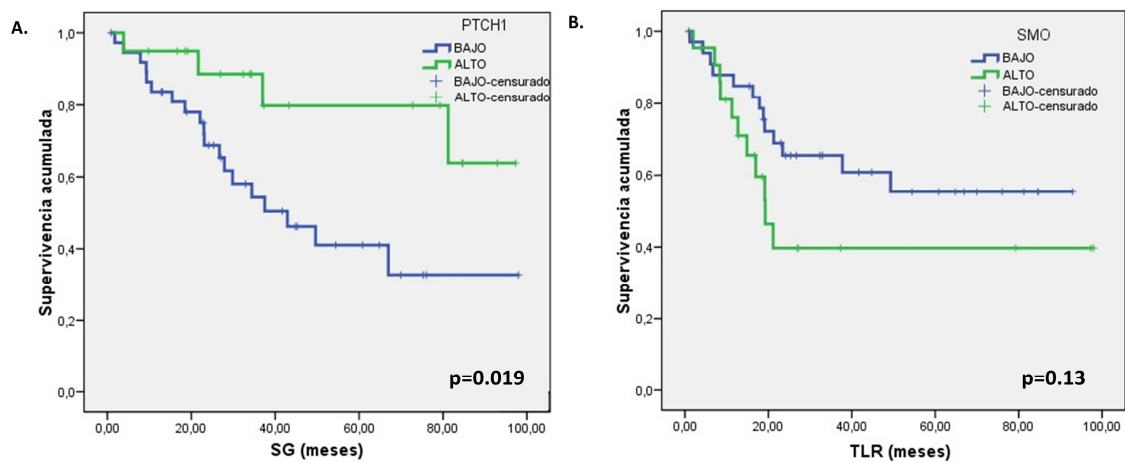


Figura 41. Curva Kaplan Meier para *PTCH1* y *SMO* en el subgrupo de pacientes con histología adenocarcinoma. A) SG (supervivencia global) en función de la expresión de *PTCH1*. B) TLR (tiempo libre de recaída) en función de la expresión de *SMO*. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión de los genes superiores a la mediana. SG: supervivencia global.

B) HÁBITO TABÁQUICO

Los análisis del valor pronóstico de los genes seleccionados se realizaron en función del hábito tabáquico. El estudio de la supervivencia en la población fumadora (Figura 42.A y C), reveló que los niveles de expresión aumentada de *SMO* y *HEY1* se relacionan con un peor pronóstico, al mostrar una disminución del TLR ($p = 0.077$ y $p = 0.039$, respectivamente). Además también se ha observado que el subgrupo de pacientes cuyos tumores tienen niveles de expresión más elevados de *NOTCH1* y/o *HEY1* presentan un peor curso clínico de la enfermedad, con intervalos libres de recaída más cortos comparados con los pacientes con niveles de *NOTCH1* y *HEY1* con valores inferiores a la mediana de expresión (Figura 42.B). Estos resultados siguen la tendencia que se ha observado previamente en la población general.

Por su parte, en la población fumadora también hemos observado que niveles superiores de expresión de *MYC* se correlacionan con mayor TLR ($p=0.026$) (Figura 42.D), en concordancia con los análisis previamente realizados.

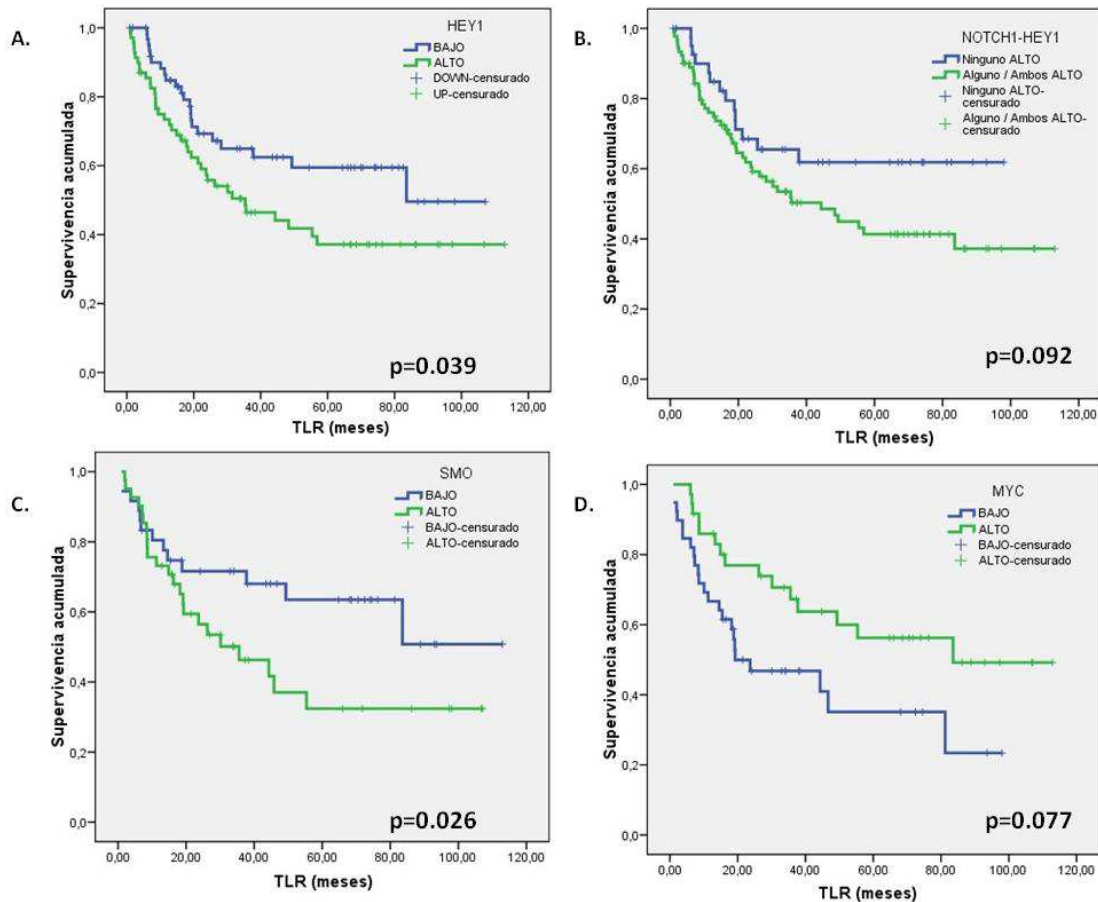


Figura 42. Curva Kaplan Meier para *HEY1*, *NOTCH1-HEY1*, *SMO* y *MYC* en la población fumadora. A. TLR (tiempo libre de recaída) en función de la expresión de *HEY1*. B. TLR (tiempo libre de recaída) en función de la expresión de *MYC*. C. TLR (tiempo libre de recaída) en función de la expresión de *SMO*. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión superiores a la mediana. D) TLR (tiempo libre de recaída) en función de la expresión combinada de *NOTCH1-HEY1*. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana de ambos genes y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión superiores a la mediana de alguno o de ambos genes.

C) TRATAMIENTO ADYUVANTE

Si analizamos la cohorte de acuerdo al tratamiento recibido tras la cirugía, podemos diferenciar dos grupos de pacientes: aquellos que recibieron quimioterapia adyuvante y los que no reciben ningún tipo de tratamiento después de la resección quirúrgica (generalmente pacientes en estadios I-II en los que no se ha demostrado beneficio en supervivencia al tratarlos con quimioterapia).

Es de remarcar que, aquellos tumores que tenían niveles de *MYC* por encima de la mediana, cuando eran tratados con quimioterapia, se asociaban con un mejor pronóstico (SG: $p = 0.011$, Figura 43 A). Sin embargo, en el grupo de pacientes que no fueron tratados en adyuvancia, el

valor pronóstico de *MYC* no es significativo (Figura 43.B). Según estos resultados, *MYC* podría jugar un papel como biomarcador para seleccionar aquellos pacientes que se benefician de recibir un tratamiento adyuvante basado en combinaciones con sales de platino. Un estudio en el que se tuvo en cuenta a pacientes diagnosticados de CPNM con enfermedad localmente avanzada o metastásica que han presentado recaída después del tratamiento quimioterápico, o que presentan contraindicaciones para recibir este tipo de terapias, puso de manifiesto que la expresión de *MYC* junto con *EIF3H* (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H*) en CPNM, daba como resultado una mejora de la supervivencia y la respuesta al tratamiento con Gefinitib (Cappuzzo et al. 2009). Los valores de *CCND1* y *WNT5A* también reflejaron una tendencia similar, pero no fueron estadísticamente significativos ($p = 0.081$ y $p = 0.053$, respectivamente) (Figura 44).

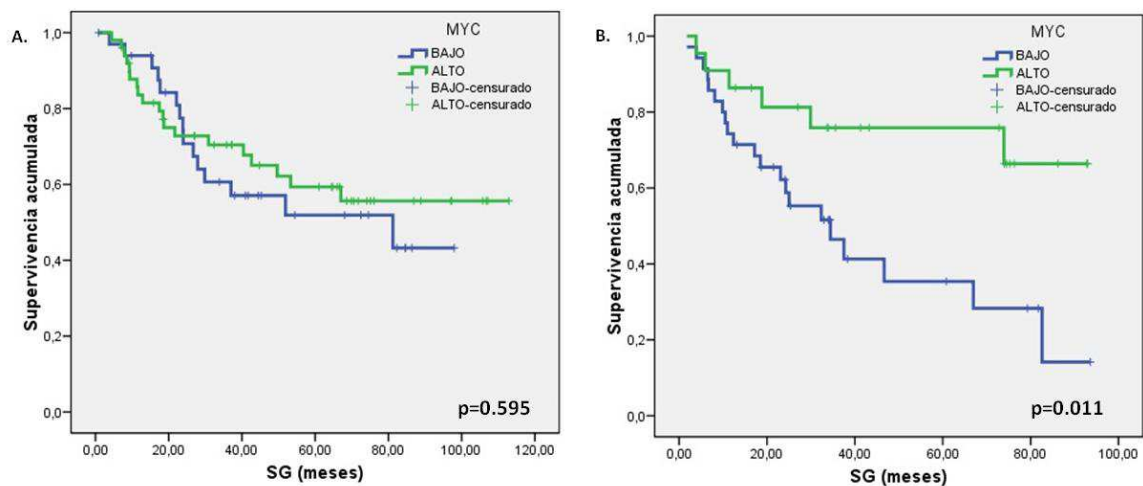


Figura 43. Curva Kaplan Meier para *MYC* en función del tratamiento de quimioterapia postoperatoria. A. Pacientes que no recibieron tratamiento quimioterápico tras la cirugía. B. Pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico tras la cirugía. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión superiores a la mediana. SG: supervivencia global.

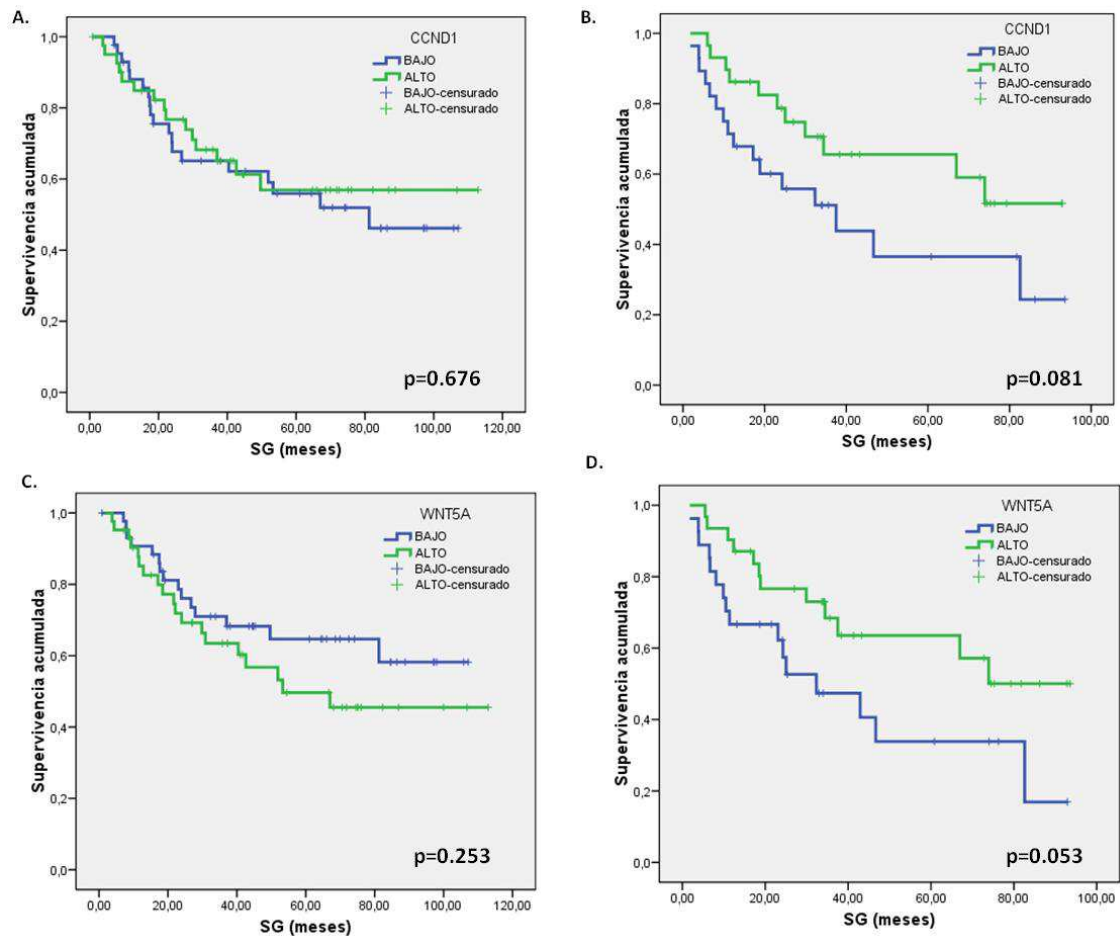


Figura 44. Curva Kaplan Meier para *CCND1* y *WNT5A* en función del tratamiento de quimioterapia postoperatoria. A y C. Pacientes que no recibieron tratamiento quimioterápico tras la cirugía. B y D. Pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico tras la cirugía. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión superiores a la mediana. SG: supervivencia global.

Con el objetivo de confirmar esta relación entre la expresión génica y la respuesta a quimioterapia, se buscaron relaciones entre agrupaciones de genes de cada vía y la supervivencia. En este caso, y siguiendo con los resultados obtenidos hasta el momento, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al agrupar los genes *MYC* y *CCND1* comparando la relación con los pacientes dependiendo de si habían sido tratados con quimioterapia o no. A nivel global, los resultados reflejaron un aumento de la SLR ($p = 0.035$) cuando ambos genes están expresados por encima de la mediana en comparación con el grupo que sólo uno o ningún gen está altamente expresado. Al realizar el mismo análisis en la población dependiendo del tratamiento, se observó también una mejora significativa de la SG ($p = 0.014$) en el grupo que había recibido quimioterapia adyuvante, algo que no se apreciaba en el grupo que no la había recibido (Figura 45). De esta forma, se sigue observando una

influencia clara de la expresión alta de *MYC* y *CCND1* que puede estar influyendo en la respuesta frente a la quimioterapia, y por lo tanto, en los niveles de supervivencia globales.

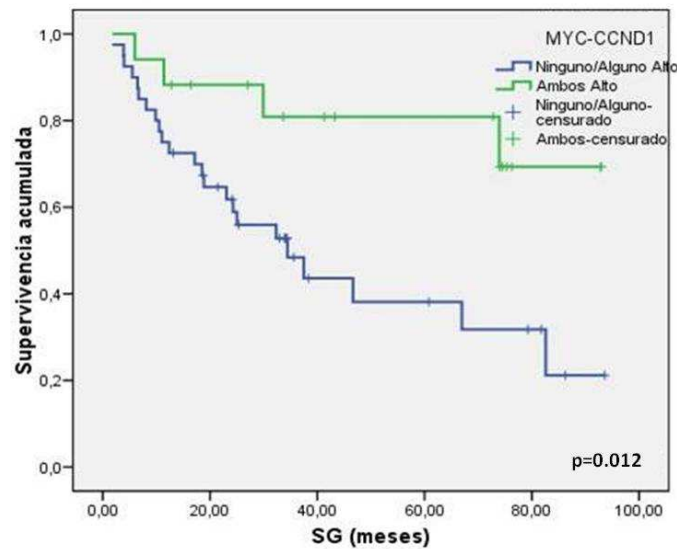


Figura 45. Curva Kaplan Meier para *MYC-CCND1* en la población que había recibido quimioterapia postoperatoria. La serie azul engloba a aquellos pacientes que presentan valores de expresión de los genes inferiores a la mediana en ambos genes y la serie verde engloba al grupo de pacientes que presentan valores de expresión superiores a la mediana en alguno o en ambos genes. SG: supervivencia global.

4.2.7. Análisis multivariante de Cox.

Finalmente, se realizó un análisis multivariante utilizando el modelo de regresión de Cox, con el objetivo de determinar que variables de las estudiadas son de pronóstico independiente. En este caso, se analizaron todas aquellas variables, tanto clínico-patológicas como de expresión, que resultaron significativas en los estudios de supervivencia realizados con el método de Kaplan-Meier.

Los análisis referentes a las variables clínico-patológicas, incluyeron el tamaño tumoral, dicotomizado en mayor o hasta de 3.5 cm, la infiltración ganglionar y la quimioterapia postoperatoria.

Tabla 22. Análisis multivariante de las características clínico-patológicas (Regresión de Cox).

Variable	TLP		
	HR	95% IC	p
Tamaño (>3.5 cm ≤3.5 cm,)	1.578	0.973 – 2.562	0.065
Infiltración (Sí o No)	1.617	0.965 – 2.709	0.068
Quimioterapia (Sí o No)	1.184	0.707 – 1.986	0.521

*p<0.05. p: p-valor. TLP (tiempo libre de progresión). HR (Hazard ratio). IC (intervalo de confianza).

Respecto al estudio de la supervivencia en función de los valores de expresión génica relativa, se realizaron estudios multivariantes para el gen *MYC*, al ser el único gen de la vía Wnt que ofreció resultados significativos en los análisis anteriores. Se valoró el TLP en la población formada por fumadores activos, y la SG en la población general y en pacientes con quimioterapia postoperatoria, al igual que para la agrupación de los genes *MYC* y *CCND1*. Los resultados revelaron que el gen *MYC* es una variable de pronóstico independiente en la población general ($p = 0.023$) y en los pacientes que recibieron quimioterapia ($p = 0.016$), y que también lo es la agrupación de este gen con *CCND1* ($p = 0.021$) (Tabla 23). Los resultados obtenidos, destacan el papel de *MYC* como un marcador pronóstico independiente en pacientes tratados con quimioterapia post-operatoria, mejorando la supervivencia global de estos, como ya han puesto de manifiesto algunos estudios, como el de Cappuzzo *et al.* en pacientes tratados con gefitinib (Cappuzzo *et al.*, 2009).

Por último, se realizó el análisis multivariante de *HEY1* en la población formada por los fumadores activos, y el de *PTCH1* en tumores de histología ADC, resultando ambos como variables de pronóstico independiente con $p = 0.042$ y $p = 0.026$, respectivamente.

Tabla 23. Análisis multivariante de la expresión relativa de *MYC*, *HEY1* y *PTCH1* en diferentes poblaciones.

Variable	TLP		
	HR	95% IC	p
<i>MYC</i> en fumadores activos	0.615	0.372 – 1.016	0.058
<i>HEY1</i> en fumadores activos	1.726	1.021 – 2.919	0.042*
<i>PTCH1</i> en ADC	0.283	0.093 – 0.861	0.026*

	SG		
	HR	95% IC	p
<i>MYC</i>	0.553	0.332 – 0.922	0.023*
<i>MYC</i> en pacientes con quimioterapia	0.324	0.129 – 0.810	0.016*
<i>MYC-CCND1</i> en pacientes con quimioterapia	0.283	0.097 – 0.828	0.021*

*p<0.05. p: p-valor. TLP (tiempo libre de progresión). SLP (supervivencia libre de progresión). HR (Hazard ratio). IC (intervalo de confianza).

En resumen, varios de los genes estudiados como *HEY1*, *MYC* o *PTCH1*, de las vías de señalización Notch, Wnt y Hedgehog implicadas en el comportamiento biológico de la población de CSC en el tumor, han resultado tener valor como marcadores de pronóstico independientes en CPNM en estadios resecables. En este sentido, también se ha encontrado que *MYC* junto con *CCND1* y *WNT5A* pueden ser marcadores de respuesta en los pacientes que reciben quimioterapia post-operatoria. Paralelamente, los análisis univariantes de supervivencia, además de respaldar los resultados observados en el análisis multivariante, mostraron que altos niveles de *SMO* y de *NOTCH1-HEY1* se asociaban a un peor pronóstico. No obstante, a pesar de que la técnica de RTqPCR ha permitido analizar la expresión diferencial de la mayoría de los genes estudiados, no se ha conseguido evaluar la expresión del gen *WNT1* mediante este procedimiento.

5. CONCLUSIONES

1. El protocolo utilizado para el aislamiento del ARN a partir de muestras de tejido sano y tumoral, así como la preservación del ARN extraído a -80°C , han permitido obtener un material de cantidad y calidad suficientes para llevar a cabo estudios de cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR.
2. La técnica de elección RT-qPCR ha resultado ser una técnica eficaz y sensible para evaluar la expresión génica relativa de los genes *NOTCH1*, *HEY1*, *NOTCH3* (vía Notch), *DKK1*, *FZD7*, *WNT5A*, *MYC* y *CCND1* (vía Wnt), *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* (vía Hedgehog), *EPCAM1*, *ALDH1A1*, *ABCG2* y *ALCAM*.
3. Los análisis de correlación entre los niveles de expresión génica de los diferentes genes en el estudio, tanto a nivel general, como a nivel intraindividuo, han revelado:
 - a. Correlaciones positivas entre los genes de las tres rutas estudiadas (Notch, Wnt y Hedgehog) implicadas en la proliferación y mantenimiento de la población de células madre en el tumor, demostrando el papel activo de las mismas en la cohorte de estudio.
 - b. Correlaciones positivas entre los genes que caracterizan un fenotipo de CSC, poniendo de manifiesto que estos genes se expresan de manera conjunta y por tanto pueden constituir una firma característica para identificar CSC en CPNM en estadios resecables.
4. En los análisis de correlación entre las características clínico-patológicas y los niveles de expresión génica en la cohorte se observó que:
 - a. En varones se presentan niveles de expresión de *SHH* más bajos y niveles de expresión de *HEY1* y *FZD7* superiores.
 - b. En la población fumadora hay mayor expresión de *NOTCH3*, sin embargo *ABCG2* y *SHH* parecen estar menos expresados en fumadores.
 - c. Según el tipo histológico, hay diferencias en cuanto a la expresión de los genes *ALDH1A1*, *HEY1*, *NOTCH1*, *FZD7*, *WNT5A*, *MYC*, *PTCH1*, *GLI1* y *SMO*, estando más expresados en tumores epidermoides; mientras que *EPCAM1* se encuentra más expresado en adenocarcinoma.
5. Los análisis de supervivencia, reflejaron que un mayor tamaño tumoral, la afectación linfática y la progresión se relacionan con un peor pronóstico, al igual que ocurre con pacientes tratados con quimioterapia tras la operación.

6. Los análisis de supervivencia considerando el nivel de expresión de los genes estudiados revelaron que:

a. Hay una tendencia a la asociación de mayores niveles de *HEY1* con un peor pronóstico tanto en la población global, como en fumadores como en el subgrupo que presentan histología epidermoide. Además el subgrupo de pacientes que presentan altos niveles de *HEY1* junto con altos niveles de *NOTCH1* llevan asociado un peor pronóstico. Por el contrario, altos niveles de *NOTCH1* y *NOTCH3* se asocian con una mejor supervivencia global.

b. Los valores de expresión aumentados de *MYC*, se asociaron a un mejor pronóstico en la población general, al igual que en los fumadores, y en los pacientes que reciben quimioterapia tras la operación. El análisis conjunto de *MYC* con *CCND1* muestra también una mayor supervivencia con quimioterapia post operacional.

c. Niveles bajos de *PTCH1* y niveles altos de *SMO* se asocian a un mejor curso clínico de la enfermedad en adenocarcinomas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alamgeer, M., Ganju, V., Szczepny, A., et al., 2013. The prognostic significance of aldehyde expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*, 1, pp.1–10.
- Alamgeer, M., Ganju, V. & Watkins, D.N., 2013. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(3), pp.394–401.
- Allen, T.D. et al., 2011. Activated Notch1 Induces Lung Adenomas in Mice and Cooperates with Myc in the Generation of Lung Adenocarcinoma. *Molecular and cellular pathobiology*, 71(9), pp.6010–6019.
- Anastas, J.N. & Moon, R.T., 2013. WNT signalling pathways as.
- Bender Kim, C.F. et al., 2005. Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell*, 121, pp.823–835.
- Bolós, V. et al., 2013. Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Research*, 15(4), p.R54.
- Bosetti, C. et al., 2013. Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Annals of Oncology*, 24(10), pp.2657–2671.
- Camps, C. et al., 2011. The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 72(3), pp.365–369.
- Cappuzzo, F. et al., 2009. MYC and EIF3H Coamplification significantly improve response and survival of non-small cell lung cancer patients (NSCLC) treated with gefitinib. *Journal of thoracic oncology.*, 4(4), pp.472–478.
- Carney, D.N. et al., 1982. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. *Stem cells*, 1(3), pp.149–164.
- Carney, D.N., Gazdar, A.F. & Minna, J.D., 1980. Positive Correlation between Histological Tumor Involvement and Generation of Tumor Cell Colonies in Agarose in Specimens Taken Directly from Patients with Small-Cell Carcinoma of the Lung. *Cancer research*, 40, pp.1820–1823.
- Chan, B.A. & Hughes, B.G.M., 2015. Targeted therapy for non-small cell lung cancer : current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*, 4(17), pp.36–54.
- Chen, K., Huang, Y. & Chen, J., 2013. Understanding and targeting cancer stem cells : therapeutic implications and challenges. *Nature Publishing Group*, 34(6), pp.732–740.
- Chen, Y. et al., 2011. Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer biology and therapy*, 11(June 2015), pp.14–21.
- Chi, S. et al., 2006. Activation of the hedgehog pathway in a subset of lung cancers. *Cancer Letters*, 244(1), pp.1–7.

- Clement, V. et al., 2007. Report HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth , Cancer Stem Cell. *Current Biology*, 17, pp.165–172.
- Clevers, H. & Nusse, R., 2012. Review Wnt / b -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149, pp.1192–1205.
- Coate, L.E. et al., 2009. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology*, 10(10), pp.1001–1010.
- Crino, L. et al., 2011. Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *ASCO Meeting Abstracts*, 29(15_suppl), p.7514.
- Donnem, T. et al., 2010. Prognostic Impact of Notch Ligands and Receptors in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Cancer*, pp.5676–5685.
- Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), pp.11–22.
- Egloff, A.M.; Grandis, J.R., 2012. Molecular Pathways: Context-dependent approaches to Notch targeting as cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 18(19), pp.5188–5195.
- Eliasz, S. et al., 2010. Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene*, 29(17), pp.2488–2498.
- Eramo, A. et al., 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation*, 15(3), pp.504–514.
- Eramo, A., Haas, T.L. & Maria, R. De, 2010. Lung cancer stem cells : tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene*, 29(33), pp.4625–4635.
- Evangelista, M., Tian, H. & De Sauvage, F.J., 2006. The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(20 PART 1), pp.5924–5928.
- Fan, X. et al., 2006. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Research*, 66(15), pp.7445–7452.
- Ferlay, J. et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359–E386.
- Flaherty, J.D.O. et al., 2012. The Cancer Stem-Cell Hypothesis. *Journal of thoracic oncology.*, 7(12), pp.1880–1890.
- Freedman, N., 2008. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 29(6), pp.997–1003.
- Fry, J.S. et al., 2013. How rapidly does the excess risk of lung cancer decline following quitting smoking? A quantitative review using the negative exponential model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(1), pp.13–26.
- Fujiwara, K. et al., 2014. CD166/ALCAM Expression Is Characteristic of Tumorigenicity and Invasive and Migratory Activities of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(9), p.e107247.

- Gandini, S. et al., 2008. Tobacco smoking and cancer : A meta-analysis. *International Journal Cancer*, 122, pp.155–164.
- Gialmanidis, I.P. et al., 2009. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 66(1), pp.64–74.
- Goldstraw, P. et al., 2011. Non-small-cell lung cancer. *The Lancet*, 378(9804), pp.1727–1740.
- Gottschling, S. et al., 2012. Are we Missing the Target ? – Cancer Stem Cells and Drug Resistance in Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer genomics & proteomics*, 286, pp.275–286.
- Gridelli, C. et al., 2015. Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*.
- Groot, P. De & Munden, R.F., 2012. Lung cancer Epidemiology Risk factors and Prevention. *Radiologic Clinics of NA*, 50(5), pp.863–876.
- Guo, S., Liu, M. & Gonzalez-Perez, R.R., 2011. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1815(2), pp.197–213.
- Han, L. et al., 2013. Cancer stem cells : therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2), pp.65–75.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell*, 100, pp.57–70.
- Hassan, K.A. et al., 2013. Notch Pathway Activity Identifies Cells with Cancer Stem Cell – like Properties and Correlates with Worse Survival in Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(8), pp.1972–1981.
- Hirsch, F.R. et al., 2003. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of clinical oncology*, 21(20), pp.3798–3807.
- Hirschmann-Jax, C., 2004. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *PNAS*, 101(39), pp.14228–14233.
- Ho, M.M. et al., 2007. Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res*, 67(10), pp.4827–4834.
- Horn, L. & Pao, W., 2009. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*, 27(26), pp.4232–4235.
- Huang, C. et al., 2008. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 44(17), pp.2680–2688.

- Huang, C.-L. et al., 2005. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology.*, 23(34), pp.8765–8773.
- Ishikawa, M. et al., 2014. Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), p.253.
- Jantus-lewintre, E. et al., 2012. Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung cancer: Targets and Therapy*, 3, pp.21–29.
- Karnoub, A.E. & Weinberg, R.A., 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(7), pp.517–531.
- Khuder, S. a & Mutgi, A.B., 2001. Effect of Smoking Cessation on Major Histologic Types of Lung Cancer. *Chest*, 120(5), pp.1577–1583.
- Kikuchi, A. et al., 2012. Wnt5a : its signalling , functions and implication in diseases. *Acta Physiologica*, 204, pp.17–33.
- Koch, W.H., 2004. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov*, 3(9), pp.749–761.
- Koivunen, J.P. et al., 2008. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clinical cancer research*, 14(13), pp.4275–4283.
- Konishi, J. et al., 2010. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene*, 29, pp.589–596.
- Kreso, A. & Dick, J.E., 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), pp.275–291.
- Lai, E.C., 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development (Cambridge, England)*, 131(5), pp.965–973.
- Lauth, M. et al., 2007. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *PNAS*, 104(20), pp.8455–8460.
- Levina, V. et al., 2008. Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells : Cytokine Network , Tumorigenic and Metastatic Properties. *PLoS ONE*, 3(8), pp.1–16.
- Liang, S.-C. et al., 2015. ABCG2 Localizes to the Nucleus and Modulates CDH1 Expression in Lung Cancer Cells. *Neoplasia*, 17(3), pp.265–278.
- Lortet-tieulent, J. et al., 2014. Lung Cancer International trends in lung cancer incidence by histological subtype : Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*, 84(1), pp.13–22. A
- Lugli, a et al., 2010. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 103(3), pp.382–390.

- Lv, J. et al., 2010. Association of Wnt1 = b -Catenin with Clinical Pathological Characteristics and Prognosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 14(3), pp.363–369.
- Lynch, T.J. et al., 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of Non-Small-Cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 350, pp.877–889.
- Maitah, M.Y. et al., 2011. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-b1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS ONE*, 6(1), pp.1–14.
- Malvezzi, M. et al., 2014. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology*, 25(8), pp.1650–1656.
- Martinez-Romero, A. et al., 2014. Multi-color flow cytometry immunophenotyping for detection of CSC in NSCLC. *European Journal of Cancer*, 50(Supplement 6), p.115.
- Mazieres, J. et al., 2005. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Letters*, 222, pp.1–10.
- McCaffrey, L.M. & Macara, I.G., 2011. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology*, 21(12), pp.727–735.
- Medema, J.P., 2013. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 15(4), pp.338–344. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2717>.
- Mishina, T. et al., 1999. Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome. *British journal of cancer*, 80(8), pp.1289–1295.
- Montanaro, F. et al., 2004. Demystifying SP cell purification : viability , yield , and phenotype are defined by isolation parameters. *Experimental Cell Research*, 298, pp.144–154.
- Myrdal, G. et al., 2001. Outcome after lung cancer surgery . Factors predicting early mortality and major morbidity. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 20, pp.694–699.
- Nakashima, T. et al., 2008. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Oncology Reports*, 19, pp.203–209.
- Ni, C. et al., 2013. Prognostic Value of CD166 Expression in Cancers of the Digestive System: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(8), pp.1–8.
- Niessen, K. et al., 2008. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *Journal of Cell Biology*, 182(2), pp.315–325.
- Osanyingbemi-Obidi, J. et al., 2011. Notch Signaling Contributes to Lung Cancer Clonogenic Capacity In Vitro but May Be Circumvented in Tumorigenesis In Vivo. *Molecular Cancer Research*, 9(12), pp.1746–1754.
- Paez, G.J. et al., 2004. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation With Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, 304, pp.112–114.

- Pao, W., Girard, N. & Lyon, D., 2011. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology*, 12(2), pp.175–180.
- Patriarca, C. et al., 2012. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), pp.68–75.
- Peacock, C.D. & Watkins, D.N., 2008. Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), pp.2883–2889.
- Peitzsch, C. et al., 2013. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiotherapy and Oncology*, 108(3), pp.378–387.
- Peters, S. et al., 2013. Lung Cancer Treatment and detection of ALK -rearranged NSCLC. *Lung Cancer*, 81(2), pp.145–154.
- Pfaffl, M.W. & Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Rae, F.K. et al., 2000. NOVEL ASSOCIATION OF A DIVERSE RANGE OF GENES WITH RENAL CELL CARCINOMA AS IDENTIFIED BY DIFFERENTIAL DISPLAY. *International Journal Cancer*, 732(July), pp.726–732.
- Ricci-Vitiani, L. et al., 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), pp.111–115.
- Robey, R.W. et al., 2007. ABCG2: Determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1), pp.39–57.
- Saijo, N., 2012. Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), pp.63–67.
- Salnikov, A. V et al., 2010. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 126(4), pp.950–958.
- Santagata, S. et al., 2004. Advances in Brief JAGGED1 Expression Is Associated with Prostate Cancer Metastasis and Recurrence. *Cancer Research*, 64(617), pp.6854–6857.
- Sasco, A.J., Secretan, M.B. & Straif, K., 2004. Tobacco smoking and cancer : a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45, pp.3–9.
- Sawyers, C.L. et al., 2013. AACR cancer progress report 2013. *Clinical Cancer Research*, 19(SUPPL.1), pp.1–99.
- Schnell, U., Kuipers, J. & Giepmans, B.N.G., 2013. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Bioscience reports*, 33(2), pp.321–331.
- Sethi, N. et al., 2011. Article Osteolytic Bone Metastasis of Breast Cancer by Engaging Notch Signaling in Bone Cells. *Cancer Cell*, 19(2), pp.192–205.

- Sheng, S. Le et al., 2009. Clinical Significance and Prognostic Value of Serum Dickkopf-1 Concentrations in Patients with Lung Cancer. *Clinical Chemistry*, 55(9), pp.1656–1664.
- Shih, I.-M. & Wang, T.-L., 2007. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer research*, 67(5), pp.1879–1882.
- Shindo, N. et al., 2005. The ESC–E(Z) complex participates in the hedgehog signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327, pp.1179–1187.
- Shmelkov, S. V et al., 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), pp.2111–2120.
- Shojima, K. et al., 2015. Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. *Scientific Reports*, 5, pp.1–12.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2015. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), pp.5–29.
- Simon, R., 2005. Development and Validation of Therapeutically Relevant. *Journal of National Cancer Institute*, 97(12), pp.10–11.
- Singh, S.K. et al., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), pp.396–401.
- Sjölund, J. et al., 2005. The Notch pathway in cancer: Differentiation gone awry. *European Journal of Cancer*, 41(17), pp.2620–2629.
- Soda, M. et al., 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), pp.561–566.
- Song, Z. et al., 2011. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS ONE*, 6(3).
- Stewart, D.J., 2013. Wnt Signaling Pathway in Non – Small Cell Lung Cancer. , 300(5), pp.1–11.
- Stylianou, S., Clarke, R.B. & Brennan, K., 2006. Aberrant activation of Notch signaling in human breast cancer. *Cancer Research*, 66(3), pp.1517–1525.
- Sullivan, J.P. et al., 2011. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on Notch signaling. *Cancer*, 70(23), pp.9937–9948.
- Swarts, D.R. a et al., 2013. CD44 and OTP are strong prognostic markers for pulmonary carcinoids. *Clinical Cancer Research*, 19(8), pp.2197–2207.
- Tachezy, M. et al., 2014. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (CD166): An “ Inert ” Cancer Stem Cell Marker. *Stem Cells*, pp.1429–1436.
- Tao, J., Erez, A. & Lee, B., 2011. One NOTCH Further : Jagged 1 in Bone Metastasis. *Cancer Cell*, 19(2), pp.159–161.

- Taron, M. et al., 2004. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Human Molecular Genetics*, 13(20), pp.2443–2449.
- Trzpis, M. et al., 2007. Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *The American Journal of Pathology*, 171(2), pp.386–395.
- Varjosalo, M. & Taipale, J., 2008. Hedgehog : functions and mechanisms. *Genes and Development*, 22, pp.2454–2472.
- Velcheti, V. & Govindan, R., 2007. Hedgehog Signaling Pathway and Lung Cancer: *Journal of Thoracic Oncology*, 2(1), pp.7–10.
- Wang, J. et al., 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122(4), pp.761–768.
- Watkins, D.N. et al., 2003. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422(6929), pp.313–317.
- Weng, A.P. et al., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), pp.269–271.
- Westhoff, B. et al., 2009. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), pp.22293–22298.
- Whang, Y.M. et al., 2013. Wnt5a Is Associated with Cigarette Smoke-Related Lung Carcinogenesis via Protein Kinase C. , 8(1), pp.1–8.
- Wilson, A. & Radtke, F., 2006. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Letters*, 580(12), pp.2860–2868.
- Xu, X. et al., 2011. Aberrant Wnt1 / β -Catenin Expression is an Independent Poor Prognostic Marker of Non-small Cell Lung Cancer After Surgery. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(4), pp.716–724.
- Xu, X. et al., 2014. The cell of origin and subtype of K-Ras-induced lung tumors are modified by Notch and Sox2. *Genes an*, 28, pp.1929–1939.
- Yao, L. et al., 2014. Overexpression of Wnt5a promotes angiogenesis in NSCLC. *BioMed Research International*, 2014, pp.1–8.
- Yu, Z. et al., 2012. Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), pp.2144–2151.
- Yuan, X. et al., 2014. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), pp.1–10.
- Zakaria, N. et al., 2015. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer*, 15(1), pp.1–16.

Zhang, D.E.G. et al., 2014. Isolation , cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells. *Oncology Letters*, 9, pp.47–54.

Zhong, Y. et al., 2007. Most MCF7 and SK-OV3 cells were deprived of their stem nature by Hoechst 33342. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, pp.338–343.

7. ANEXOS

A. COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO.

Expresión de genes de la ruta NOTCH en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios tempranos.

Congreso: XV Congreso SEOM. Madrid, 2015.

Aceptada como: Comunicación Oral.

Andrea PalomarRios¹, Silvia Calabuig-Fariñas^{1,2}, Sandra Gallach¹, Marta Usó^{1,3}, Ana Blasco⁴, Ricardo Guijarro⁵, Eloisa Jantus-Lewintre^{1,6}, Carlos Camps^{1,3,4}.

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia

²Departamento de Patología, Universitat de Valencia

³Departamento de Medicina, Universitat de Valencia

⁴Servicio de Oncología Médica, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

⁵Servicio de Cirugía Torácica, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

⁶Departamento de Biotecnología. Universitat Politècnica de Valencia

Introducción: Las células madre tumorales (CSC), responsables de la recurrencia y la resistencia en CPNM, presentan genes diferencialmente expresados que pueden usarse como biomarcadores. La vía Notch parece jugar un papel fundamental en la biología de las CSC, por lo que el objetivo de este estudio es analizar la expresión diferencial de estos genes en CSC y su relación con el pronóstico en CPNM resecable.

Materiales y Métodos. Se analizó mediante RTqPCR la expresión relativa de *EPCAM1*, *ABCG2*, *ALDH1A1*, *CD166*, *NOTCH1*, *NOTCH3*, *HEY1*, *MYC*, *CCND1*, usando como controles endógenos: *ACTB*, *GUSB* y *CDKN1B* en 178 muestras de tumor y tejido normal adyacente.

Resultados: La edad media de la cohorte es de 64 años, el 66% presentaban PS= 0 y un 48% eran SCC.

Los análisis de correlación entre expresión génica y variables clínico-patológicas mostraron que: los tumores de histología SCC presentaron niveles de expresión superiores de *HEY1* ($p < 0,001$), *NOTCH1* ($p < 0,001$) y *MYC* ($p < 0,001$), mientras que en los ADC lo estaban *EPCAM1* ($p=0,038$) y *CCND1* ($p=0,056$). *NOTCH3* presentaba mayores niveles de expresión en pacientes fumadores ($p=0,013$), mientras que en varones había un aumento significativo de la expresión

de *HEY1* ($p=0,037$). Se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de expresión de *NOTCH1* y *HEY1* ($p<0,001$) y entre *NOTCH3* y *NOTCH1* ($p<0,001$). Los análisis de supervivencia (método de Kaplan-Meier, estadístico log-rank) demostraron que menor expresión de *NOTCH3* se asocia con una menor supervivencia global tanto en la población general ($p=0,05$) como en fumadores ($p=0,036$).

Conclusión: Los genes de la ruta NOTCH muestran expresión diferencial de acuerdo a las características clínicas de los pacientes analizados, siendo *NOTCH3* un posible biomarcador de pronóstico en CPNM en estadios reseccables.

EXPRESSION OF NOTCH PATHWAY GENES IN RESECTABLE NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC).

Congreso: 15th International ASEICA Congress. Sevilla, 2015.

Aceptada como: Póster.

Andrea PalomarRios¹, Silvia Calabuig-Fariñas^{1,2}, Sandra Gallach¹, Marta Usó^{1,3}, Ana Blasco⁴, Ricardo Guijarro⁵, Eloisa Jantus-Lewintre^{1,6}, Carlos Camps^{1,3,4}.

¹ Molecular Oncology Laboratory, General University Hospital of Valencia Research Foundation

² Department of Pathology. Universitat de Valencia

³ Department of Medicine. Universitat de Valencia.

⁴ Department of Medical Oncology, General University Hospital of Valencia

⁵ Department of Thoracic Surgery, General University Hospital of Valencia

⁶ Department of Biotechnology. Universitat Politècnica de Valencia

Introduction: Cancer stem cells (CSC), which are responsible of the resistance against treatments and recurrence in NSCLC, exhibit genes differentially expressed that could be used as biomarkers. Notch pathway seems to play a determinant role in CSC biology, leading to the maintenance of stem cell population in tumor. Therefore the aim of this study is to analyze differences in expression in a set of NOTCH's pathway related genes and to correlate them with prognosis in a cohort of resectable NSCLC.

Objectives: To establish the relationship between clinical outcome and the expression levels of Notch pathway genes (*NOTCH1*, *NOTCH3*, *HEY1*, *MYC* and *CCND1*) and genes that could be characteristic of CSC phenotype as *EPCAM1*, *ABCG2*, *ALDH1A1* and *ALCAM* (*CD166*).

Methods. RNA was isolated from 178 paired frozen tumor and normal tissue samples. RTqPCR was performed to analyze relative expression of *EPCAM1*, *ABCG2*, *ALDH1A1*, *CD166*, *NOTCH1*, *NOTCH3*, *HEY1*, *MYC* and *CCND1* genes. For normalization, three endogenous controls were used (*ACTB*, *GUSB* and *CDKN1B*). Relative expression levels were correlated with clinical and pathological characteristics of the cohort. All statistical analyses were considered significant at $p < 0.05$.

Results: Median age of the cohort was 64 year, 86.5% were males, good performance status (PS=0) was present in 66% of the patients and 48% of the samples were SCC. Correlation analysis between expression levels and pathological features of the patients showed that in SCC samples, the expression levels of *ALDH1A1* ($p=0.01$), *HEY1* ($p < 0,001$), *NOTCH1* ($p < 0,001$) and *MYC* ($p < 0,002$) were higher than in ADC. On the other hand, the relative expression of *EPCAM1* was higher in ADCs ($p=0.038$). Higher expression levels of *NOTCH3* were found in smokers patients ($p=0.013$), whereas *HEY1* expression was higher in males ($p=0.037$).

In order to make comparisons and correlations between variables, continuous variables were dichotomized using the median as a cut off. Positive correlations (χ^2 test) were observed between *NOTCH1* and *HEY1* ($p < 0,001$), *NOTCH1* and *ALDH1A1* ($p < 0,001$), and between *HEY1* and *ALCAM* ($p=0.01$). Also positive correlation were found between genes that featured CSC phenotype such as *EPCAM1* and *ABCG2* ($p=0.003$), *EPCAM1* and *ALCAM* ($p=0.005$), *ALCAM* and *ALDH1A1* ($p < 0,001$) and *ALDH1A1* and *ABCG2* ($p < 0,001$).

Survival analysis (Kaplan-Meier, Log-rank test) revealed no statistical differences between gene expression and the clinical outcome. However, higher expression levels of *HEY1* tended to be associated with a poor prognosis, showing lower overall survival ($p=0.118$). This trend is also observed in squamous histology ($p=0.13$) and smoker population ($p=0.038$) where time to progression decrease with higher expression levels of *HEY1*. Moreover, as a strong positive correlation was seen between expression levels of *NOTCH1* and *HEY1*, survival analysis performed considering expression levels of *NOTCH1* and *HEY1* showed, although it lacks of significance, lower time to progression if one of these two genes, or both, are highly expressed ($p=0.092$). This tendency is observed also when smoker population is considered ($p=0.092$).

Conclusion: The expression levels of Notch signaling pathway genes are significantly correlated with *ALDH1A1* and *ALCAM*, which seems to be characteristics of the lung CSC. The combination

of higher levels of expression of *NOTCH1* and *HEY1* is associated with a poor outcome, and therefore could have prognostic implications in early-stage NSCLC.

EXPRESSION OF HEDGEHOG PATHWAY GENES IN EARLY STAGE NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC).

Congreso: 15th International ASEICA Congress. Sevilla, 2015.

Aceptada como: Póster.

Adrián Cabezas Fuster¹, Andrea Palomar Rios¹, Silvia Calabuig-Fariñas^{1,2}, Ester Munuera¹, Enrique Pastor³, Rut Lucas⁴, Carlos Camps^{1,5,6}, Eloisa Jantus-Lewintre^{1,7}

¹ Molecular Oncology Laboratory, General University Hospital of Valencia Research Foundation

² Department of Pathology. Universitat de Valencia

³ Department of Thoracic Surgery, General University Hospital of Valencia

⁴ Department of Science History and Documentation. Universitat de Valencia.

⁵ Department of Medical Oncology, General University Hospital of Valencia

⁶ Department of Medicine. Universitat de Valencia.

⁷ Department of Biotechnology. Universitat Politècnica de Valencia

Introduction: Cancer stem cells (CSC), which are responsible of the resistance against treatments and recurrence in NSCLC, exhibit genes differentially expressed that could be used as biomarkers. There are several signaling pathways that are thought to be active in lung CSC. So, genes belonging to these pathways could be used as biomarkers and new therapeutic targets in NSCLC. Hedgehog pathway, that is active in cancer stem cells, is thought to play a determinant role in CSC biology, leading to the maintenance of stem cell population in tumor. Therefore analyzing differences in expression patterns of Hedgehog pathway genes in paired, tumor / normal lung samples from patients in resectable stages of NSCLC is an interesting approach to identify new biomarkers that could be related to prognosis in these patients.

Objectives: The aim of this study is to establish the relationship between clinical outcome and the expression levels of *SHH*, *PTCH1*, *GLI1* and *SMO* in patients with resectable NSCLC.

Materials and methods. RNA isolated from 178 paired frozen tumor / normal tissue was retrotranscribed in order to perform RTqPCR analysis. Relative gene expression of *SHH*, *PTCH1*, *GLI1* and *SMO*, was analyzed by RTqPCR using hydrolysis probes TaqMan Gene Expression Assays (Life technologies) and were normalized against three endogenous control genes: *ACTB*,

GUSB and *CDKN1B*. P-value < 0.05 was considered statistically significant in the analysis performed.

Results: Cohort included 178 patients with resectable stage of NSCLC. Median age was 64 year, 86.5% were males, 66% of PS = 0 and 48% SCC. We found that two genes were overexpressed in tumor samples compared with normal lung samples: *SMO* (2.59X) and *GLI* (1.75X) in the entire cohort. Correlation analysis revealed differences within gene expression levels and clinic-pathological features: *SHH* appeared to be down-regulated in males ($p=0.011$), smokers (0.007) and advanced stages ($p=0.011$). Regarding the histological type: *PTCH1* ($p=0.021$), *GLI* ($p=0.006$) and *SMO* ($p=0.0001$) were overexpressed in SCC compared with other histologies.

Positive correlations (variables were dichotomized using the median as cut off, chi square test) were observed between *PTCH1* and *SHH* ($p<0.001$), *PTCH1* and *GLI1* ($p<0.001$), *PTCH1* and *SMO* ($p<0.001$), *SHH* and *GLI1* ($p<0.001$) and *GLI1* and *SMO* ($p<0.001$).

Survival analysis (Cox's regression) showed that an increase in *SHH* expression levels leads to a poor prognosis in RFS ($p=0.017$). Moreover, there is a tendency to worse outcome in the group of patients with higher levels of expression of *PTCH1* ($p=0.016$), especially in the group of adenocarcinomas ($p=0.019$). In smokers, there is an association between higher expression levels of *SMO* and shorter RFS in active smokers ($p=0.077$), whereas in stage I patients, high expression of *SMO* ($p=0.09$) is related with worse progression.

Conclusion: There are increased expression levels of Hedgehog pathway genes in SCC. *SMO*, *PTCH1* and *SHH* could be used as a prognostic biomarker in early stages of NSCLC, allowing the identification of a subgroup of patients characterized by a poor outcome.