

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**“Resistencia a drogas inducida por concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino. Determinación del Gen MDR1 en sangre periférica como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón”.**

**“Drug resistance induced by plasmatic concentrations of paclitaxel and carboplatin. MDR1 gene expression in peripheral blood as marker of treatment response in lung cancer”.**

Memoria presentada por Dña. Raquel Luque Caro  
para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad de Granada

Granada, 15 de Mayo de 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Raquel Luque Caro  
D.L.: GR. 2595-2009  
ISBN: 978-84-692-3854-7



**D. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Raquel Luque Caro ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Resistencia a drogas inducida por concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino. Determinación del Gen MDR1 en sangre periférica como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón”** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 15 de Mayo de 2009.

Fdo. Dr. Jose Carlos Prados Salazar

**Dña. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Raquel Luque Caro ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Resistencia a drogas inducida por concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino. Determinación del Gen MDR1 en sangre periférica como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón”** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 15 de Mayo de 2009.

Fdo. Consolación Melguizo Alonso

**Dña. ANTONIA ARANEGA JIMENEZ**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Raquel Luque Caro ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Resistencia a drogas inducida por concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino. Determinación del Gen MDR1 en sangre periférica como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón”** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 15 de Mayo de 2009.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez



*A mis amados Jose, Javi y María*

*A mis padres y a mi abuela Antonia, a los que debo todo lo que soy*

*A mis hermanos*



## Agradecimientos

Han pasado seis años desde que plantamos la semilla de este trabajo que hoy, tras mucho esfuerzo y emociones, da su fruto.

Este fruto no hubiera sido posible sin la ayuda y dirección de D<sup>a</sup> Antonia Aránega. Gracias por haberme dado esta oportunidad. Gracias por ofrecerme el soporte tecnológico y económico del Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Gracias por saber esperar

***Quiero recordar a D. Luis Alvarez, que no está entre nosotros. Es un ejemplo de gran persona y profesional incansable. Tengo que agradecerle su amabilidad, su trato afable y sus palabras de aliento.***

A José Carlos Prados y Consolación Melguizo... Este proyecto se habría quedado en el camino si no os hubiésteis cruzado en mi vida. Habéis sabido comprender mis otras tareas diarias, me habéis apoyado, alentado, empujado... Lo que aquí aparece es tan mío como vuestro, incluso más vuestro. Gracias por vuestra paciencia y confianza. Siempre creísteis en mí, como yo creo en vosotros.

A Ana Rosa Rama y Raúl Ortiz, incorporados recientemente a la Sección de Investigación Básica Cardiovascular, y que me han ayudado en la realización de este trabajo de investigación.

A Huria Boulaiz, Octavio Caba y Fernando Rodríguez,

A Macarena Peran, Fidel Hita, Esmeralda Carrillo, Juan Antonio Marchal, Celia Velez, y Antonio Martínez como miembros del Grupo.

A todo el personal del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Granada.

Quiero expresar mi gratitud al Servicio de Análisis Clínicos y de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves y al Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por haber puesto a mi disposición parte de la infraestructura y material necesario para la realización de esta tesis.

Yo no sabría nada de lo que aquí se expone sin la Unidad de Oncología Médica del H.U. Virgen de las Nieves. Médicos, enfermeras, auxiliares, secretarias... Gracias por vuestra disponibilidad y comprensión. Todos hacéis que mi día a día sea maravilloso.

Juan Ramón (por tantas cosas...), Encarna (amiga...), Pedro, Antonio, Javier, Vero, Carlos, Carmen, Berta, Bea, Vicky, Arancha, Pilar, Rosa, Isabel... Gracias por vuestra acogida profesional pero sobre todo personal.

A Mariví Fernández Feijoó por su atención en la Unidad de Citostáticos del Hospital. A Pablo Bueno, por la aportación en microarrays. A Sabina Pérez, por el asesoramiento en la estadística.

A mi familia,

A mi marido, Jose, y a mis hijos Javi y María...

Mis padres, Francisco, el primer motor de todo esto, ¡papá lo conseguí!, y Eugenia, mi modelo de madre, mi madre modelo, lugar de descanso y diversión.

Mi abuela Antonia que siempre va conmigo y que tanto me ha dado

Mis hermanos M<sup>a</sup> Eugenia, Javi y Natalia,

Manolo y María,

Mariví, Yolanda y Fernando, mis sobrinillos Sara, Javi y Alejandro.

Estoy "llena de vosotros", y creo que hay pocos niños tan queridos como los míos gracias a vuestro amor.

No puedo olvidarme de los pacientes que han participado en esta investigación, y de todos los pacientes con cáncer. Gracias por vuestra generosidad, vuestra lucha diaria, vuestras lecciones y alegría de vivir.

Gracias

*"And in the end the love you take is equal to the love you make"*

# Indice

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	
1. Epidemiología	9
2. Etiología	10
3. Histología	14
4. Clínica	18
5. Diagnóstico/Estadificación	24
6. Clasificación por estadios	29
7. Tratamiento	32
8. Screening	50
9. Factores pronóstico	50
10. Alteraciones genéticas en el CPCNP	54
11. El fenotipo de resistencia a múltiples drogas: fenotipo mdr	57
11.1. Fenotipo mdr	57
11.1.1. ABC transporters	59
11.1.2. ABCB1 o Glicoproteína P o PgP	62
11.1.3. ABCC o Multidrug Resistance –Associated Protein o MRP	67
11.1.4. ABCG2 o Breast Cancer Resistance Protein o BCRP	74
11.1.5. Lung Resistance Related Protein o LRP	77
11.2. Estudios sobre el fenotipo mdr en tumores sólidos y neoplasias hematológicas.	80
11.3. Estudios sobre el fenotipo mdr en cáncer de pulmón células no pequeñas.	85
11.4. Estudios en sangre del fenotipo mdr	91
11.5. Inhibidores del fenotipo mdr	92
OBJETIVES	94
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Líneas celulares	97
2. Cultivo de líneas celulares	97
3. Congelación y descongelación de las líneas celulares	98
4. Agentes farmacológicos	99
5. Estudios de proliferación celular	99
6. Estudio de la morfología celular	101
7. Estudio de los fenómenos de apoptosis	101
8. Determinación de apoptosis mediante microscopio confocal	103
9. Determinación de genes de resistencia en líneas celulares	104
10. Estudio de modificación de expresión génica en pacientes afectados de CPCNP	107
11. Pacientes. Grupos de estudio	115

12. Aislamiento de PMN de sangre periférica	116
13. Determinación de MDR1 en sangre periférica de pacientes	117
14. Estudio estadístico	119
RESULTADOS	
1. Modulación de la proliferación de líneas derivadas de CPCNP por la acción del paclitaxel a concentraciones plasmáticas	120
2. Modulación de la proliferación de líneas derivadas de otros tumores por la acción del paclitaxel a concentraciones plasmáticas	123
3. Modulación de la proliferación de líneas derivadas de CPCNP por la acción del carboplatino a concentraciones plasmáticas	125
4. Modulación de la proliferación de líneas derivadas de otros tumores por la acción del carboplatino a concentraciones terapéuticas	127
5. Combinación de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas: efecto sobre la proliferación de líneas celulares	130
6. Combinación de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas: efecto sobre la morfología de las líneas tumorales	130
7. Estudio de la apoptosis inducida por paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas	139
8. Valoración microscópica del fenómeno de apoptosis inducida por los fármacos	141
9. Patrones de resistencia inducida por el tratamiento de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas	148
10. Modulación génica en pacientes con CPCNP tratados con paclitaxel y carboplatino. Análisis mediante array	157
11. Estudio de la modulación en la expresión de MDR1 en sangre periférica de pacientes con CPCNP	172
DISCUSIÓN	187
CONCLUSIONS	210
BIBLIOGRAFIA	213



# Summary

Lung cancer (LC) is one of the main health problems in the world due to the high mortality rate and the increasing incidence during the last years.

About 180,000 new cases of LC are diagnosed every year in Europe, with a mortality rate of 85%-90% of these patients. Cigarette smoking is the major cause of LC today. Epidemiologic studies of cohorts established the causal relationship between smoking and LC in men and women. It is estimated that 80% of men and 75% of women with LC will die because of cigarette smoking.

Two groups of LC are characterized according to the cell pattern, evolution, and treatment response: small-cell lung cancer (SCLC), representing 20% of the LC diagnosed, and non-small cell lung cancer (NSCLC), representing 80% of the LC cases, the latter being a heterogeneous group which includes epidermoid carcinoma or squamous cells, adenocarcinoma, and large cell carcinoma, most of them showing several cell patterns. NSCLC growth is usually slower and less aggressive than SCLC.

However, NSCLC is the major cause of cancer death, mainly due to metastatic dissemination. Cancer healing percentage is under 15%, however the risk of death has decreased during the last years.

NSCLC staging ranges from I to IV, according to the TNM classification. In stages I and II the disease is localized. In this case, treatment and surgery play a main role in the therapeutic strategy. In stage III, the disease has spread to more than one location in the chest (loco-regional disease). In stage IV, the tumour has spread to other distant sites in the body. Survival percentage in stage III reaches 10-20% after 5 years, and in stage IV under 5% after two years.

Chemotherapy is recommended in this type of cancer, both at early and advanced stages of the disease, since a better quality of life, evolution, and survival rate of the patients has been demonstrated with treatment.

However, NSCLC is sometimes chemoresistant and does not respond to treatment; several factors are involved in the development of chemoresistance, such as multidrug resistance (MDR) phenotype, mainly. This phenotype is the major cause of chemotherapy failure. It has been related to several proteins expression: P-glycoprotein(PgP), MRP (MRP1-7) family, Lung Resistance Related Protein (LRP), and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). PgP,



MRP, and BCRP are members of the ATP-binding-cassette (ABC) transporters family. LRP is the major component of “vault complex”. ABC transporters are members of a protein family able to transport a wide variety of substrates such as lipids, bile salts, toxins, and antigen-presenting peptides. This transport process is carried out across the membrane against a concentration gradient and gained from ATP hydrolysis. Antineoplastic drugs from natural sources such as taxanes, vinca-alkaloids, anthracyclines, and epipodophyllotoxins are some of the ABC transporters substrates.

Solid tumours studies about the expression of these proteins have been carried out on experimental cell lines and tumoral tissue samples. Results are variable, due mainly to the different methods used. However, the relationship between the expression of these markers and chemotherapy resistance is clear. Some studies have been carried out to detect these proteins levels in peripheral blood cells, without conclusive results.

The analysis of the genes expression in peripheral blood is feasible and can provide important information to the patient. The possible determination of these proteins means a new research line, since it could act as prognostic markers of the disease.

The aim of our research was to study chemotherapy resistance in NSCLC patients through the MDR phenotype in cell lines and blood of patients with the disease. We used 5 different cell lines. A549 and A427 cell lines were derived from lung epithelial carcinoma. The NODO line was obtained from lung carcinoma metastasis, and 3 cell lines derived from other tumours such as gastric cancer (GAS), seminoma (SEM), and, breast cancer (MCF7). The cell lines were exposed to paclitaxel, carboplatin, and the combination of both drugs. The drugs were provided from the pharmacy of the Virgen de las Nieves Hospital. The concentrations we used were similar to the plasma concentrations observed in patients treated previously.

We studied the impact in cell proliferation, apoptosis induction, and mdr1 and MRP3 expression, after individual and combined administration of both drugs.

The MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used to measure cell proliferation changes. Metabolization of the

compound to a formazan salt is produced by viable cells but not by non-viable cells. Optical density was measured at 570 and 690nm with colorimetric techniques (Titertek multiscan). Values were transformed into values of numbers of cells; the statistical program Statgraphics plus V5.0 for Windows was used to obtain the progression line. A Nikon Eclipse Ti optical microscope was used to study cell morphology after 8, 24, 48, and 72 hours, and a follow-up of several weeks was carried out.

Apoptosis was studied using Annexin V technique as well as propidium iodide staining technique. A Leica DMI6000 inverted microscope was used to cell analysis.

We employed the RT-PCR technique to determine the expression of MDR1 and MRP3 resistance genes in the different cell lines; quantification was made by densitometry, using beta-actine gene expression as control.

In order to analyse the possible changes in gene expression produced by paclitaxel and carboplatin therapy in LC patients, we carried out a study using arrays in peripheral blood PMN of two patients with NSCLC. Baseline determination was made before treatment and after 21 days of treatment. The study was based on MDR resistance genes.

According to the results, we studied MDR1 gene expression in peripheral blood PMN of 23 patients with NSCLC, before and after paclitaxel-carboplatin treatment, in order to establish whether it is able to be a predictive factor of response and prognostic factor of the disease. Blood extraction of 5ml was made to each patient before and after chemotherapy. PMN pellet and RNA of cells were obtained from the patients. RNA was checked with agarose gels, and later RT-PCR technique was carried out using specific primers.

Our results showed that plasma concentrations of paclitaxel reduced importantly cell proliferation, both in lines derived from primary tumours (A549, A427) as well as those derived from metastases (NODO). Paclitaxel produced an inhibition of proliferation significantly lower in the lines derived from other tumours than in LC cell lines. In LC cell lines, carboplatin produced a lower reduction in cell proliferation than paclitaxel. Also, inhibition of proliferation in cell lines derived from other tumours was lower than in those derived from LC. An increase in the inhibition of proliferation was found when cell lines are

exposed to the association of both drugs, compared to the individual use of the drugs.

Morphological study was carried out only after using the combination of paclitaxel-carboplatin at plasma concentrations.

A549 and A427 cell lines showed morphological changes with the presence of “empty spaces of cells”, due to cellular death. However, in both cases, we observed small nuclei of cells that replicated in the presence of the drugs, similarly to the parental cells, and were able to form a new monolayer. This fact suggests that cells were treatment resistant. The NODO cell line showed a significantly lower growth rate, and no “empty spaces of cells” were found; however a decreased cell density was observed. No proliferation nuclei were found, but we observed the presence of living cells with replication capacity, but lower than parental cells. SEM cell line did not show morphological changes itself, but a reduction in the cell density. This cell line also showed nuclei of cells that replicated. GAS cell line behaviour was similar to that of SEM line, suggesting that treatment with paclitaxel-carboplatin was less efficient in both cases. MCF-7 cell line behaviour was similar to that of A549 cell line.

Apoptosis study in cell lines after treatment with paclitaxel, carboplatin, and paclitaxel- carboplatin combined therapy showed that both drugs induced apoptosis in all the cell lines, although carboplatin induced-apoptosis was some higher. Also, apoptosis rate increased when both drugs were added.

We also studied the resistance pattern induced after treatment with paclitaxel, carboplatin, and the combination of both.

A549 cell line did not show basal expression of MDR1, but a weak basal expression of MRP3 was observed. After chemotherapy, we observed that paclitaxel induced MDR1 and carboplatin induced MRP3. The combination of both drugs induced the expression of both cell lines, however, when paclitaxel is associated to carboplatin, MRP3 expression did not increase significantly.

A427 cell line did not show basal expression of MDR1 and MRP3. Paclitaxel induced MDR1 and carboplatin induced MRP3. As previously occurred, the association of both drugs increased significantly the expression of MDR1, and very few the expression of MRP3.

NODO cell line did not show any basal expression. Paclitaxel induced MDR1 and carboplatin induced MRP3.

Behaviour of cell lines derived from other tumours was similar to that of LC cell lines. They did not show any basal expression. Paclitaxel induced MDR1 in all cell lines. Carboplatin did not induce MDR1 as previously, nor MRP3 in GAS cell line.

Finally, we studied MDR gene expression in blood of LC patients. Microarrays were performed in 2 patients, and overexpression of transporting proteins related to drug resistance (MDR1 and LRP) after treatment with paclitaxel-carboplatin was observed. These results lead us to study 23 patients with NSCLC, advanced stages in most of the cases, who had not received treatment previously. Only MDR1 expression was studied. All these patients received chemotherapy with paclitaxel-carboplatin. After treatment, we found overexpression of MDR1 in 22 patients. Expression levels were randomly distributed, so that overexpression under 3 was considered low level of expression, and overexpression above 4 was considered high level of expression. High levels were found in 11 patients, and low levels were observed in the other 11 patients.

The major aim of this study was to determine the relationship between MDR1 expression and the treatment response, which was found to be not significant. No significant differences in expression were found in the other variables: gender, tobacco habit, weight loss at the diagnosis, tumour staging, and tumour histology. No correlation was found between MDR1 expression and survival rate. Our aim was to study the real utility of the MDR resistance genes in predicting treatment response and disease prognosis.

Today, other molecular markers, such as ERCC1 and BRCA1, are being studied as predictive response factors to certain drugs, and as prognostic factors of the disease. As in our case, the aim of these studies was to establish genetic profiles that could have some sensitivity or treatment resistance, in order to reach a personalized antitumour therapy to each NSCLC patient. Our results in cell lines are in agreement with those of other studies performed in tumour lines and/or tumour tissues.

Therefore, MDR1 expression and MRP family can be a very important resistance mechanism in NSCLC.

Nevertheless, the extended study of biomolecular markers in tumour tissue is very complex. So, the analysis of the genes in peripheral blood should be done since it could provide continuous information about the biological behaviour of the tumour.

In our study, we found an increase in MDR1 expression after chemotherapy. However, no relationship was found between this fact and the treatment response or survival rate; so that, we can conclude that MDR1 expression in peripheral blood is not a predictive factor for treatment response nor a prognostic factor of the disease. Despite these results, further studies are necessary on molecular biology of NSCLC in order to try to establish subgroups of patients based on genetic profiles, in which the use of microarrays could be very useful.

# Introducción

## **1. EPIDEMIOLOGÍA.**

El cáncer de pulmón (CP) ha sido una enfermedad rara hasta la segunda mitad del siglo XX (González Barón, 2006). Sin embargo, en el momento actual constituye uno de los mayores problemas de salud en el mundo por su elevada incidencia y mortalidad. Representa el 12.4% del total de casos nuevos de cáncer y supone el 17.5% de las muertes por enfermedades tumorales. Es la causa más frecuente de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, en Europa, EEUU y China. Se estima que tiene una incidencia anual de 1,2 millones de casos y una mortalidad global anual de 1,1 millones (Parkin y cols, 2001). Esta escasa diferencia refleja la letalidad de este tumor. La mediana de supervivencia es inferior al año; la supervivencia relativa a los 5 años es menor del 15%; y, los esfuerzos para mejorar estas cifras han sido lentos, y frecuentemente frustrantes.

En la década de los 70, España ocupaba uno de los últimos lugares en cuanto a frecuencia de CP en Europa, mientras que los países del norte y centro presentaban tasas más elevadas. Sin embargo estas diferencias han disminuído significativamente por las medidas antitabaco llevadas a cabo en estos países.

En España se diagnostican unos 18500 casos nuevos al año. La razón varón: mujer es de 4,5 en Europa y de 11 en España. El consumo de tabaco de las mujeres españolas empieza a traducirse en un aumento de CP. De hecho, la mortalidad por CP está empezando a superar la mortalidad por cáncer de mama en algunos países, hecho que se ha constatado ya en EEUU (Peto y cols., 1992).

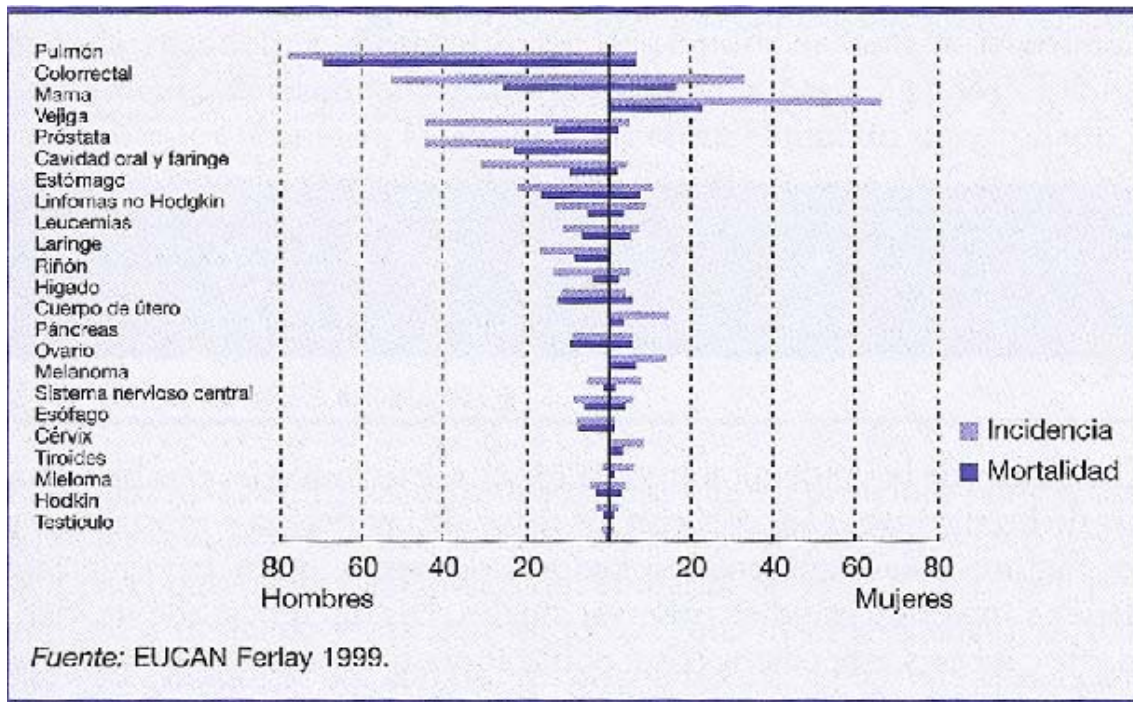


Figura 1. Incidencia-Mortalidad por cáncer en España.

## 2. ETIOLOGÍA.

### Tabaco

El tabaco es el agente etiológico más importante en el desarrollo del CP. Hablar de CP es hablar del tabaco (López Vivanco, 2005). Estudios epidemiológicos han establecido la relación causal entre tabaco y CP. En 1950, Doll y Hill demostraron claramente la asociación entre fumar y mortalidad por CP. Se estima que el tabaco es el responsable del 90% del CP. El riesgo de padecer un CP a lo largo de la vida es entre 20 y 30 veces mayor en un fumador que en un no fumador. Así, aproximadamente el 18% de los fumadores desarrollará esta enfermedad.

Actualmente se conocen algunos mecanismos por los que el tabaco provoca CP.



El cigarrillo contiene alrededor de 300 sustancias químicas, de las cuales 60 son carcinógenos reconocidos, de acuerdo con la International Agency for Research on Cancer (Hoffmann y cols., 2001). Los carcinógenos más importantes son los hidrocarburos policíclicos como el benzopireno y la nitrosamina específica del tabaco, la 4-metilnitroamino-1-3piridil-1-butanona (NKK). Éstos inducen carcinomas pulmonares en roedores, de histología y perfil molecular idéntico al CP en humanos.

La NKK produce mutaciones en el protooncogen K-ras, mientras que el benzopireno induce mutaciones en p53 (Denissenko y cols. 1996; Smith y cols., 2000).

La nicotina no se considera como carcinógeno en sí, aunque puede ser convertida en carcinógeno y actúa como cocarcinógeno, ya que activa vías de señalización que contribuyen a la transformación celular.

Los puros contienen más tabaco que los cigarrillos, por lo que son tan o más carcinógenos que éstos.

Fumar aumenta el riesgo de padecer cualquier tipo histológico de CP, pero principalmente de carcinoma epidermoide y carcinoma microcítico.

La cantidad de cigarrillos fumados y los años de hábito, guardan relación con el riesgo. La edad de mayor riesgo es al final de los 40, con otro pico a final de los 70 (Burns y cols., 1996). En sentido contrario, el riesgo disminuye con el abandono del tabaco, sobre todo a partir del 5º año (Alberola, 1999). Los estudios de cohortes establecen que el riesgo se reduce en los exfumadores de más de 15 años entre un 80 y 90% respecto a los fumadores activos. Sin embargo, el riesgo permanece elevado incluso tras periodos de abstinencia más largos (Newcomb y cols., 1992).

A esto hay que añadir el aumento de riesgo de CP en los fumadores pasivos, hecho más controvertido. Diferentes estudios epidemiológicos caso-control y de cohortes apuntan que el humo del tabaco en el ambiente explicaría el 25% de los casos de CP en la población no fumadora. El humo en el ambiente presenta una composición semejante a la inhalada por el fumador. El riesgo de CP es proporcional al nivel de exposición. De hecho, los fumadores pasivos excretan carcinógenos del tabaco en la orina, con una proporción del 1 al 5% de los niveles excretados por fumadores (Janerich y cols., 1990).

Por todo ésto, la reducción en el consumo de tabaco es la medida de Salud Pública más importante que los países pueden adoptar para beneficio de su salud y economía.

### **Exposición ambiental**

Asimismo, hay que considerar agentes documentados como carcinógenos relacionados con la actividad laboral (Tabla 1). A este grupo pertenecen sustancias como radón y asbesto, y otros como arsénico, berilio, cromo, hidrocarburos, níquel y radiación ionizante (Alberola, 1999). El riesgo de CP que supone la exposición a éstas sustancias es difícil de cuantificar porque generalmente se trata de exposiciones prolongadas a bajos niveles de estos agentes, y el intervalo de tiempo entre la exposición y el desarrollo de la enfermedad es variable y a menudo largo. Además existen factores de confusión como la exposición a diferentes sustancias al mismo tiempo, como el tabaco.

En general, fumar potencia los efectos carcinógenos de estas sustancias.

<b>SUSTANCIA</b>	<b>ACTIVIDAD LABORAL</b>
<b>Arsénico</b>	<b>Fundidores, pesticidas</b>
<b>Asbesto</b>	<b>Mineros, molineros, ferrocarril, astilleros</b>
<b>Berilio</b>	<b>Industrias electrónicas, aeroespaciales, reactores nucleares</b>
<b>Eteres de clorometilo</b>	<b>Resinas de intercambio iónico</b>
<b>Cromo</b>	<b>Trabajadores con cromados y pigmentos</b>
<b>Hidrocarburos</b>	<b>Trabajadores con gas de hulla y techos</b>
<b>Gas Mostaza</b>	<b>Trabajadores con gases tóxicos</b>
<b>Níquel</b>	<b>Refinerías</b>
<b>Radiaciones (radón)</b>	<b>Minas de uranio y otras</b>

**Tabla 1.** Carcinógenos relacionados con la actividad laboral.

La mayoría de los estudios demuestran una asociación entre asbesto y CP, aunque algunas investigaciones no confirman esta relación (Coggon y cols., 2003). Lo que si parece claro, es que el riesgo de CP se multiplica si a la exposición a asbesto se suma el hábito de fumar.

El radón es un producto gaseoso de degradación emitido por uranio 238 y el radio 226. En los trabajadores de minas de uranio se ha observado un incremento de CP (Darby y cols., 2005). El radón es capaz de dañar el epitelio respiratorio por la emisión de partículas alfa

Las radiaciones ionizantes inducen daño en el ADN. La exposición a radiaciones y el desarrollo de CP varía en función de la intensidad y duración de la exposición (Sekido y cols., 2005). Se ha observado que los pacientes con patologías como tuberculosis o espondilitis anquilosante, sometidos a exploraciones radiológicas durante largos periodos, tienen un incremento de CP mínimo. Sin embargo, los pacientes aquejados de linfoma o cáncer de mama que reciben radioterapia externa sobre axila, fosa supraclavicular o mediastino, presentan un aumento del riesgo de CP. El periodo de latencia es de 5 a 10 años.

### **Predisposición genética**

La mayoría del CP se atribuye al hábito de fumar. Sin embargo, aproximadamente solo el 20% de los fumadores desarrolla un CP, lo que sugiere que es necesaria una susceptibilidad genética. La familia de genes implicada en la carcinogénesis incluye oncogenes, principalmente familia ras, erb1 y 2, TGF alfa; y, genes supresores, fundamentalmente p53, p16 y bcl2 (Sekido y cols., 2005 ).

### **Dieta**

La información arrojada por estudios sobre CP y dieta no es definitiva. Parece que concentraciones bajas de vitaminas A y E se asocian al desarrollo de CP, pero los datos son contradictorios. No está claro que el consumo de frutas y verduras disminuya el riesgo de CP (Sekido y cols., 2005).

### 3. HISTOLOGÍA.

Existen diversas clasificaciones nosológicas.

La clasificación de la Organización Mundial de Salud, OMS (Tabla 2), aceptada en todo el mundo, es la más utilizada (Travis y cols., 2004). Se basa en criterios de microscopía óptica.

En líneas generales, el CP se divide en dos grandes grupos por sus características histológicas, curso clínico y respuesta al tratamiento:

- el cáncer de pulmón células pequeñas (CPCP) o microcítico, que representa el 20% del total de cánceres de pulmón; y
- el cáncer de pulmón células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico, que correspondería al 80% restante.

Aunque su origen celular es el mismo, debido a distintos factores estimuladores y diferenciadores celulares autocrinos y paracrinos, constituyen dos entidades con distinto comportamiento biológico y manejo terapéutico. El CP derivaría de una célula pluripotencial, capaz de expresar una variedad de fenotipos (Sekido y cols., 2005; Mariño y cols., 2006).

El CPCNP constituye un grupo heterogéneo que incluye el carcinoma epidermoide o de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes, como miembros más representativos (Figura 1). La mayoría muestra más de un patrón histológico.

El CPCNP suele tener un crecimiento más lento y menos agresivo que el CPCP, a pesar de lo cual supone la causa de muerte por cáncer más importante. La muerte se produce principalmente por diseminación metastásica.

### **1. Lesiones preinvasivas**

Displasia escamosa/carcinoma in situ  
Hiperplasia adenomatosa atípica  
Hiperplasia celular neuroendocrina difusa idiopática neuroendocrina

### **2. Lesiones invasivas malignas**

#### A. Carcinoma de células escamosas o epidermoide

Papilar  
Células claras  
Células pequeñas  
Basaloide

#### B. Carcinoma de células pequeñas

Combinación

#### C. Adenocarcinoma

Acinar  
Papilar  
Bronquioloalveolar  
Mucosecretor  
Adenocarcinoma con distintos subtipos

#### D. Carcinoma de célula grande

Carcinoma neuroendocrino de células grandes  
Carcinoma basaloide  
Carcinoma linfoepitelioma-like  
Carcinoma de células claras  
Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide

#### E. Carcinoma Adenoescamoso

#### F. Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos

#### G. Tumores Carcinoides

Carcinoide Típico  
Carcinoide Atípico

#### H. Carcinomas de tipo glándula salivar

#### I. No clasificables

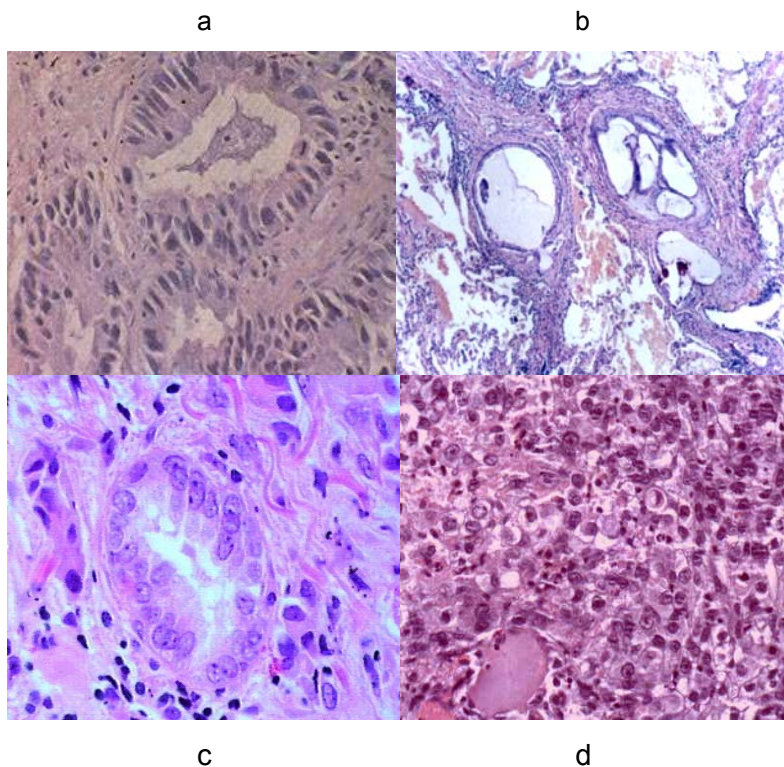
**Tabla 2.** Clasificación Histológica de la OMS.

La posibilidad de curación está por debajo del 15%, aunque el riesgo de muerte ha disminuido en los últimos años.

El **carcinoma epidermoide** representa aproximadamente el 30% del CP. Es el que más se relaciona con el hábito de fumar. Es un tumor epitelial maligno con diferenciación escamosa que se caracteriza histológicamente por presencia de puentes intercelulares, perlas córneas y queratinización celular. Su presentación más frecuente es central, afectando los bronquios segmentarios e invadiendo los lobares y principales por extensión. Es un tumor de crecimiento lento, pudiendo pasar 3-4 años desde carcinoma in situ a tumor que produzca síntomas. Tiende a ser agresivo localmente, y afectar estructuras adyacentes por contigüidad, con menos frecuencia de metástasis a distancia que el adenocarcinoma.

El **adenocarcinoma** supone el 30-40% de los CP. Actualmente es la entidad más frecuente. Es un tumor epitelial maligno que se caracteriza histológicamente por formación de glándulas y producción de mucina. Se origina en zonas periféricas, en el epitelio alveolar o glándulas de la submucosa, incluso sobre áreas de fibrosis como cicatrices antiguas. Presenta varios patrones de crecimiento que suelen combinarse, sobre todo en tumores de gran tamaño, lo que se denomina adenocarcinoma mixto.

Existe un subtipo con características propias que es el *adenocarcinoma bronquioloalveolar*, con un supuesto origen en los neumocitos tipo 2. Los criterios diagnósticos incluyen CP en ausencia de adenocarcinoma primario, sin origen broncogénico central, de localización periférica, con crecimiento celular en los septos alveolares e intersticio intacto. Se caracteriza por células columnares con abundante mucina en el polo apical y núcleos pequeños. Se suelen presentar de 3 formas diferentes: como un nódulo pulmonar solitario, enfermedad multifocal o neumonía rápidamente progresiva, que se extiende de lóbulo a lóbulo, afectando finalmente los 2 pulmones. Se les considera más resistentes a los tratamientos citotóxicos y más sensibles a las nuevas terapias dirigidas.



**Figura 1.** Subtipos histológicos de CPCNP: a. Epidermoide; b. Adenocarcinoma; c. Adenocarcinoma bronquioloalveolar; d. Carcinoma de células grandes.

Excluyendo los estadios muy precoces T1N0, el adenocarcinoma tiene peor pronóstico estadio por estadio que el epidermoide.

El **carcinoma de células grandes** es el de menor incidencia, aproximadamente un 15% de los CP. Se caracteriza por ser un tumor muy indiferenciado, con células grandes, con abundante citoplasma y nucleolo pigmentado. Se puede presentar como un tumor central o periférico.

En numerosas ocasiones, se identifican características neuroendocrinas.

El carcinoma de células grandes tiene un pronóstico similar al adenocarcinoma.

La combinación de varios tipos histológicos es muy frecuente, lo que dificulta la clasificación. La inmunohistoquímica no siempre resuelve este problema, ya que existe un gran solapamiento de los perfiles antigénicos de los distintos tipos histológicos.

Los marcadores más utilizados para identificar el CPCNP son las citoqueratinas (CK), la apoproteína A del surfactante (SP-A), y el factor de transcripción del tiroides (TTF-1).

La expresión de CK está presente en todos los carcinomas, si bien su expresión disminuye en tumores indiferenciados. El tipo de CK depende del tipo de carcinoma.

La proteína SP-A se exprese aproximadamente en la mitad de los adenocarcinomas.

El TTF-1 es un marcador muy específico del CPCNP, útil sobre todo a la hora de tipificar metástasis. (Dómine y cols., 2006).

#### **4. CLÍNICA.**

El CP permanece silente durante mucho tiempo. En el momento del diagnóstico el 90% de los enfermos presenta algún síntoma. El hallazgo casual en una Radiografía (Rx) Tórax es anecdótico. Cuando se detecta radiológicamente, se estima que ha completado las tres cuartas partes de su historia natural (Dómine y cols, 2006).

El CP es más frecuente en los lóbulos superiores que en los inferiores, y en el hemitórax derecho que en el izquierdo. Los tumores superiores son más difíciles de localizar en una Rx Tórax por la superposición de otras estructuras, como arcos costales y clavícula.

Las manifestaciones clínicas del CP dependen de muchas variables, entre ellas, el tipo histológico; su localización y afectación regional; las metástasis a distancia; y, los síndromes paraneoplásicos, como la presencia del síndrome constitucional (Tabla 3).

<b>SINTOMAS Y SIGNOS</b>	<b>FRECUENCIA %</b>
Tos	<b>8-75</b>
Pérdida de peso	<b>0-68</b>



Disnea	<b>3-60</b>
Dolor torácico	<b>20-49</b>
Hemoptisis	<b>6-35</b>
Dolor óseo	<b>6-25</b>
Fiebre	<b>0-20</b>
Sdr. Vena Cava Superior	<b>0-4</b>
Disfagia	<b>0-2</b>
Estridor	<b>0-2</b>

**Tabla 3.** Frecuencia de síntomas y signos de inicio en CP. (Dominé y cols., 2006).

#### **I. Manifestaciones relacionadas con el tumor primario.**

Los síntomas locales van a depender del crecimiento del tumor. Este crecimiento puede ser central o periférico (Tabla 4).

Los tumores centrales provocarán síntomas relacionados con la afectación de bronquios principales, lobares o segmentarios proximales. Esta clínica consiste en tos, hemoptisis, disnea y obstrucción bronquial. Los tumores epidermoides y los microcíticos suelen tener un crecimiento central. Radiológicamente se observa una masa parahiliar.

Los tumores de crecimiento periférico producen con mayor frecuencia dolor y afectación pleural. Se trata principalmente de adenocarcinomas y carcinomas de células grandes. Radiológicamente se caracterizan por nódulo pulmonar y menos frecuentemente un infiltrado pulmonar.

HISTOGÍA-LOCALIZACION	CLÍNICA
CENTRALES: epidermoide, microcítico	Tos seca, hemoptisis, disnea obstructiva, estridor
PERIFÉRICOS: adenocarcinoma, carcinoma de células grandes	Tos, disnea, dolor torácico

**Tabla 4.** Crecimiento central o periférico del tumor primario. (Dómine y cols., 2006).

- Tos

La tos es el síntoma más frecuente. Se produce principalmente por invasión de la mucosa bronquial. Es un síntoma muy inespecífico, presente en la mayoría de las enfermedades pulmonares. Aparece en fumadores y EPOC, dos condiciones muy frecuentes en pacientes con CP. Por tanto, hay que tener en cuenta los cambios en las características de la tos para un diagnóstico temprano.

- Disnea

Puede observarse hasta en un 60% de los casos, asociada a aumento de tos y expectoración. Se produce por una disminución de la función pulmonar, generalmente secundaria a obstrucción de la vía aérea. Otras causas son el derrame pleural y la linfangitis carcinomatosa.

- Hemoptisis

Aparece en un 6 - 30 % de los pacientes. Se puede deber a necrosis del tumor, ulceración de la mucosa bronquial, erosión de los vasos pulmonares, neumonitis obstructiva, y más raramente a tromboembolismo pulmonar. Suele ser de escasa cuantía, principalmente en forma de esputos manchados de sangre. La hemoptisis masiva es rara, se suele producir en tumores centrales y puede ocasionar la muerte del individuo.

Ante la presencia de hemoptisis siempre hay que descartar un CP. Si la Rx Tórax fuera normal está indicado el continuar el estudio con otras pruebas como TC, citología de esputo, etc.

- Dolor torácico

Las características del dolor dependerán de la localización del tumor. Los tumores periféricos que afectan pleura parietal o pared torácica producen dolor de características pleuríticas. Los tumores centrales provocan dolor sordo por invasión del mediastino. Las lesiones apicales producen dolor neuropático por afectación del plexo nervioso.

- Fiebre

La presencia de fiebre refleja una infección respiratoria, frecuente en estos pacientes por la obstrucción de la vía aérea. De hecho, en pacientes fumadores con neumonías de repetición hay que descartar CP.

- Disfonía

Suele deberse a la afectación del nervio laríngeo recurrente izquierdo, a nivel de cayado aórtico, lo que se traduce en parálisis de la cuerda vocal izquierda.

- Otros

Tumores con importante extensión locorregional pueden producir atrapamiento de la vena cava superior (síndrome de vena cava superior), afectación pericárdica e incluso taponamiento cardíaco.

## II. Manifestaciones relacionadas con la existencia de metástasis

El 40-50% de los pacientes con CP presentan metástasis en el momento del diagnóstico. La diseminación puede ocurrir por vía linfática, hematológica o interalveolar. La mayoría de los pacientes que presentan enfermedad metastásica al diagnóstico, padecen síntomas relacionados con su enfermedad (Sorenson y cols., 1989). La clínica relacionada con la afectación a distancia dependerá de la localización implicada. Las localizaciones más frecuentes son pulmón, glándulas suprarrenales, hígado, cerebro y hueso.

LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA %
Suprarrenales	20-45
Hígado	1-35
SNC	15-20
Huesos	20-30
Adenopatías supraclaviculares	15-20
Corazón/pericardio	20
Riñón	10-15
Pleura	8-15
Tracto digestivo	12
Coroides	0-5
Piel	1-3

Tabla 5. Frecuencia de metástasis en el CP.

## III. Síndromes paraneoplásicos.

Los síndromes paraneoplásicos se definen como un conjunto de síntomas o signos no atribuidos a la invasión local del tumor ni a sus metástasis, sino que están relacionados con la liberación de sustancias biológicamente activas por las células tumorales. Estas sustancias tienen acción hormonal o humoral. En ocasiones están producidas por células normales, como respuesta a estímulos de origen neoplásico; más raramente se producen por una alteración

de la respuesta inmunitaria inducida por el tumor. No se relacionan con el tamaño del tumor.

El CP es uno de los tumores en el que con más frecuencia aparecen síndromes paraneoplásicos. De hecho se constata en un 10-20% de los pacientes (Tabla 6).

Pueden constituir el primer síntoma de esta enfermedad, e incluso pueden ser más graves que las consecuencias del propio tumor.

Entre estos síndromes, destaca el síndrome de anorexia-caquexia o síndrome constitucional, caracterizado por astenia, anorexia y pérdida de peso, que constituye un factor de mal pronóstico. Es muy frecuente la aparición de este síndrome junto a síntomas respiratorios.

<b>SISTEMICOS</b>	<b>Anorexia, caquexia, pérdida de peso</b>
<b>ENDOCRINOMETABOLICOS</b>	Hipercalcemia tumoral Ginecomastia Hipersecreción de hormona de crecimiento
<b>OSTEOARTICULARES</b>	Osteoartropatía hiperplásica Polimiositis
<b>HEMATOLOGICOS</b>	Anemia, granulocitosis, trombocitosis Coagulación vascular diseminada Tromboflebitis superficial Endocarditis trombótica no bacteriana
<b>RENALES</b>	Síndrome nefrótico
<b>NEUROLOGICOS</b>	Degeneración cerebelosa subaguda Neuropatía sensitiva subaguda Mononeuritis múltiple Síndrome de Eaton- Lambert Encefalomiелitis Neuritis óptica Mielopatías
<b>CUTANEOS</b>	Acantosis nigricans Hipertrichosis lanuginosa adquirida Acroqueratitits paraneoplásica Eritema gyratum repens Dermatomiositits

**Tabla 6.** Síndromes paraneoplásicos asociados al CPCNP. (Dómine y cols., 2006)

## **5. DIAGNÓSTICO/ ESTADIFICACIÓN.**

Ante la sospecha de CP es importante definir la extensión para establecer el estadio y así plantear la estrategia terapéutica más adecuada (Schump y cols., 2005; Fernández Navarro y cols., 2006).

Debemos seguir los siguientes pasos (Tabla 7).

- **Historia clínica y examen físico**

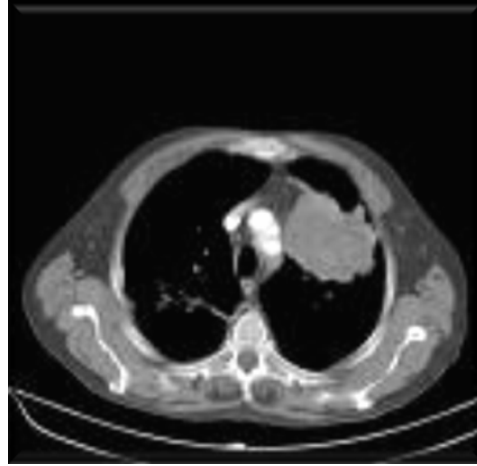
Más del 90% de los pacientes que se diagnostican de CP consultan por síntomas derivados del tumor primario, y/o de las metástasis, y/o por un cuadro constitucional debido a la neoplasia. Por tanto una historia clínica detallada, junto con una exploración física son fundamentales para sospechar un CP. Es importante recoger el hábito de fumar, el ámbito laboral y los antecedentes familiares. En relación a la clínica, además de los síntomas respiratorios, hay que incluir síntomas derivados de posible afectación metastásica como dolor óseo, déficit neurológico. Es imprescindible la realización de hemograma y bioquímica.

- **Radiografía de Tórax**

Tanto en los pacientes sintomáticos como en el pequeño porcentaje de pacientes asintomáticos, la primera evidencia de CP la proporciona la Radiografía de tórax (Figura 2). Debe de realizarse una Radiografía de Tórax posteroanterior y lateral. Nos aporta información básica sobre la localización de la tumoración, la existencia de atelectasia o derrame pleural, así como la posible afectación de la pared torácica. Aunque constituye la pieza fundamental, es insuficiente para valorar la extensión de la enfermedad. Asimismo una Radiografía de tórax normal no excluye un CP.



a



b

**Figura 2.** Radiografía (a) y TAC (b) Tórax con CPCNP.

- **Tomografía Axial Computerizada**

TC tórax y hemiabdomen superior es indispensable para determinar la extensión local, extensión regional (ganglios hiliares y mediastínicos) y existencia de metástasis a distancia (Figura 2). Además nos proporciona la información necesaria para determinar la mejor manera de filiar histológicamente la lesión. Es también la mejor prueba para distinguir tumores resecables e irresecables.

- **Resonancia Magnética Torácica**

La Resonancia Magnética no suele ser necesaria en la mayoría de los casos. En determinadas circunstancias como en localizaciones especiales como los tumores del surco superior es útil para dilucidar la relación del tumor con las estructuras anatómicas adyacentes

- **Tomografía por emisión de positrones**

La Tomografía por emisión de positrones (PET) está cobrando una gran importancia para la correcta estadificación del CP. Está indicada en el estudio de nódulos pulmonares solitarios y estudio de extensión de carcinomas no microcíticos de pulmón resecables por los métodos de imagen convencionales. Permite la detección de localizaciones tumorales, que no sería posible visualizar mediante otras técnicas. Detecta alrededor de un 15% de pacientes con metástasis que no se observarían con otros estudios. Es de gran utilidad para la valoración del mediastino, con un valor predictivo negativo que supera el 90%, de forma que si la PET es negativa a nivel mediastínico, se asume que no hay afectación a ese nivel. Si la PET es positiva a nivel mediastínico es necesario una confirmación histológica.

Además, proporciona información sobre la fisiología y actividad metabólica de la célula tumoral, por lo que también es útil para valorar respuesta del tumor a la quimioterapia.

Para fusionar esta información funcional con la resolución anatómica de la TC, se han creado los sistemas de PET-TC.

Las principales limitaciones de la PET y la PET-TC son las lesiones menores de 1cm y los falsos negativos en tumores carcinoides y carcinomas bronquioloalveolares.

- **Filiación Histológica**

En cuanto a la filiación histológica existen distintos métodos, según la localización del tumor.

Si la lesión es central o endobronquial, la técnica más útil es la Broncoscopia flexible. Además de permitir el diagnóstico histológico, arroja información sobre la extensión endobronquial del tumor. Las lesiones centrales suelen corresponder con masas endobronquiales exofíticas, o bien, lesiones que infiltran la submucosa o producen compresión extrínseca. La biopsia bronquial es la técnica más útil y más frecuente. Se recomiendan al menos tres muestras. La sensibilidad es mayor que la del lavado bronquial y el cepillado.



La punción transbronquial permite obtener muestra de adenopatías mediastínicas y de tumores submucosos que producen compresión extrínseca.

Si la localización del tumor es periférica la técnica más útil es la punción con aspiración pulmonar percutánea guiada por TC, para evitar falsos negativos. En esta situación la sensibilidad de la PAAF supera a la de la fibrobroncoscopia.

La citología de esputo es la técnica menos invasiva, pero la rentabilidad también es menor pues depende de la obtención y conservación de la muestra así como del tamaño y localización del tumor. Es útil en caso de tumor de localización central y aquellos que cursan con hemoptisis.

Si existe derrame pleural en un 90% de los casos se trata de un derrame pleural maligno. No obstante, para una correcta estadificación, es conveniente someter al paciente a una toracocentesis para realizar una citología del líquido pleural.

La mediastinoscopia permite biopsiar los ganglios linfáticos del mediastino superior. Asimismo es muy útil para la correcta estadificación de la enfermedad. Cuando la PET es positiva a nivel mediastínico es necesario confirmación histológica (Figura 3).

Muy rara vez es necesario realizar una toracotomía para poder llegar al diagnóstico histológico del CP.



**Figura 3.** PET con masa tumoral y afectación mediastínica.

- **Otros**

En situaciones concretas, en las que la clínica del paciente haga sospechar afectación tumoral, se realizará:

- Gammagrafía ósea, si el paciente presenta dolor óseo.
- TC o RMN cerebral. Es imprescindible en pacientes con clínica neurológica. Además se recomienda de forma rutinaria en los pacientes con estadio III en los que se plantea un tratamiento agresivo.
- Biopsia médula ósea, cuando aparezca pancitopenia no justificada.

<b>Cáncer de Pulmón. Estadificación</b>	
<b>Historia y examen físico</b>	
<b>Hemograma y bioquímica</b>	
<b>TAC torácico y abdomen superior</b>	
<b>TAC/ RMN cerebral si síntomas neurológicos</b>	
<b>Estadio I-II</b>	<b>Broncoscopias</b>
	<b>PET</b>
<b>Estadio III</b>	<b>Broncoscopia</b>
	<b>PET</b>
	<b>TAC/RMN cerebral</b>
<b>Estadio IV</b>	<b>PET o biopsia en casos de única lesión metastásica</b>

**Tabla 7.** Estadificación CPCNP. (Felip y cols., 2007)

## 6. CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS.

En el CPCNP podemos hablar de cuatro estadios según la clasificación TNM de 1997: I, II, III y IV (National Cancer Institute Guidelines). Los tres primeros se dividen a su vez en A y B.

Esta clasificación se establece según el tamaño y afectación a estructuras vecinas (T); afectación ganglionar (N); y afectación de órganos a distancia (M).

En 2009 se va a publicar la nueva clasificación, con algunos cambios con respecto a la de 1997.

### Definiciones TNM

#### Tumor primario (T)

- TX: El tumor primario no puede ser evaluado, o el tumor se ha comprobado por la presencia de células malignas en el esputo o secreciones bronquiales pero no ha sido visualizado por broncoscopia o imágenes
- T0: No hay prueba de tumor primario
- Tis: Carcinoma in situ
- T1: Un tumor que tiene  $\leq 3$  cm en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar o visceral, y sin prueba broncoscópica de invasión más proximal que un lóbulo bronquial (es decir, no en el bronquio principal).  
[Nota: El tumor superficial no común de cualquier tamaño con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximal al bronquio principal, también se clasifica como T1.]
- T2: Un tumor con cualquiera de las siguientes características de grado o tamaño:
  - $>3$  cm en su dimensión mayor
  - Compromete el bronquio principal y está  $\geq 2$  cm distal de la carina
  - Invade la pleura visceral
  - Está relacionado con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar pero que no compromete todo el pulmón

- T3: Un tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal de <2 cm distal a la carina pero sin compromiso de la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón
- T4: Un tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes órganos: el mediastino, el corazón, los grandes vasos, la tráquea, el esófago, el cuerpo vertebral, la carina; o tumores ganglionares separados en el mismo lóbulo; o tumor con derrame pleural maligno.  
[Nota: La mayoría de los derrames pleurales asociados al cáncer de pulmón se deben a un tumor; sin embargo, en unos pocos pacientes, los exámenes citopatológicos múltiples del líquido pleural son negativos para tumor. En estos casos el líquido no tiene sangre y no es exudativo. Dichos pacientes serán evaluados más a fondo por medio de una videotoracoscopia y biopsias pleurales directas. Cuando estos elementos y los criterios clínicos dicen que la efusión no está relacionada con el tumor, deberá ser excluida como un elemento de clasificación y el paciente deberá ser clasificado como T1, T2 o T3.]

### **Compromiso ganglionar (N)**

- NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
- N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales
- N1: Metástasis a los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales, los ganglios linfáticos hiliares ipsilaterales o ambos y los ganglios intrapulmonares incluyendo el compromiso por extensión directa del tumor primario
- N2: Metástasis al ganglio (o ganglios) linfático mediastínico ipsilateral, subcarinal o ambos
- N3: Metástasis al ganglio (o ganglios) mediastínico contralateral, hilar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclavicular

## **Metástasis a distancia (M)**

- MX: La presencia de metástasis distante no puede ser evaluada
- M0: No hay metástasis a distancia
- M1: Existe metástasis a distancia [Nota: En M1 se incluyen glándulas tumorales separadas en lóbulos diferentes (ipsilateral o contralateral).]

## **Agrupación por estadios del AJCC**

### **Carcinoma oculto**

- TX, N0, M0

### **Estadio 0**

- Tis, N0, M0

### **Estadio IA**

- T1, N0, M0

### **Estadio IB**

- T2, N0, M0

### **Estadio IIA**

- T1, N1, M0

### **Estadio IIB**

- T2, N1, M0
- T3, N0, M0

### **Estadio IIIA**

- T1, N2, M0
- T2, N2, M0
- T3, N1, M0
- T3, N2, M0

### **Estadio IIIB**

- Cualquier T, N3, M0
- T4, cualquier N, M0

## **Estadio IV**

- Cualquier T, cualquier N, M1

## **7. TRATAMIENTO.**

### **7.1. GENERALIDADES**

El CP es un grave problema sanitario causado en la mayoría de los casos por un hábito, el tabaco. Por tanto sería evitable y posible de erradicar.

En la actualidad el tratamiento cura a menos del 15% de los pacientes. Sin embargo los resultados de la investigación básica y clínica han producido un aumento en la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes. Se trata de una enfermedad compleja y heterogénea.

La cirugía es la única arma terapéutica potencialmente curativa en el CPCNP.

El objetivo debe ser la resección completa de la enfermedad. De ahí la importancia de la estadificación clínica del proceso, de acuerdo con la clasificación TNM. Con este sistema se pretende definir la estrategia terapéutica a seguir, y por tanto, seleccionar aquellos pacientes presumiblemente resecables.

Los pacientes candidatos a Cirugía incluyen estadios I y II, y algunos IIIA. De forma global podemos decir que los estadios I y II corresponden a enfermedad localizada y el tratamiento de elección es la cirugía.

El estadio III A corresponde a enfermedad regional localizada. En esta situación se suelen utilizar las tres armas: Cirugía (cada vez menos), RT y QT, aunque la secuencia no está establecida de forma estándar.

El estadio III B corresponde a enfermedad regional avanzada. El tratamiento estándar consiste en Radioterapia con Quimioterapia concomitante.

El estadio IV corresponde a la enfermedad metastásica. En este caso el tratamiento de elección es la quimioterapia con intención paliativa, si el estado general del paciente lo permite.

## 7.2. TRATAMIENTO DE ESTADIOS I Y II.

El tratamiento estándar inicial de los pacientes con estadios I y II, es la cirugía. El procedimiento quirúrgico depende de la extensión de la enfermedad y de la capacidad cardiopulmonar del enfermo. En líneas generales, es preferible la lobectomía con manguito, que la neumonectomía, siempre que sea factible, y los márgenes de resección negativos. La segmentectomía y la resección en cuña se utilizan en casos de función pulmonar muy reducida.

El papel de la linfadenectomía mediastínica es controvertido y el muestreo linfático es una buena opción. En la actualidad hay un estudio en marcha que aleatoriza los pacientes a linfadenectomía o muestreo linfático, cuyo objetivo primario es supervivencia global.

Para conseguir una estadificación patológica exacta, debe realizarse un muestreo de todas las regiones. Para catalogar la enfermedad como N0 patológico (pN0) el número de regiones linfáticas analizadas ha de ser al menos tres, o bien, como mínimo 6 ganglios resecados.

En caso de que la enfermedad sea inoperable por las circunstancias médicas del paciente, o por su rechazo a la cirugía, se debe administrar Radioterapia radical con intención curativa.

Tras la cirugía, el rango de supervivencia varía desde un 67% para los estadios IA a un 23% para el estadio IIIA (Tabla 8).

<b>ESTADIO</b>	<b>SPV a los 5 años %</b>
<b>IA</b>	<b>67</b>
<b>IB</b>	<b>57</b>
<b>IIA</b>	<b>55</b>
<b>IIB</b>	<b>38-39</b>
<b>IIIA</b>	<b>23-25</b>

**Tabla 8.** Estadios y supervivencia tras cirugía.

## ○ QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE

Las recidivas locales y a distancia limitan el poder curativo de la cirugía. La mayoría de los pacientes presentan en su evolución, recidiva a distancia, principalmente los dos primeros años, lo que sugiere la existencia de enfermedad micrometastásica oculta en el momento del diagnóstico (Dômont y cols, 2005). Las recidivas locales suponen aproximadamente el 10%. En un intento de mejorar la supervivencia de estos pacientes, se ha administrado quimioterapia adyuvante. Los estudios no incluyen pacientes con estadio IA, por su baja probabilidad de recidiva.

Los primeros estudios se realizaron con esquemas que incluían agentes alquilantes, con muy buena tolerancia pero sin beneficio en supervivencia.

A partir de 1980 comienzan a utilizarse esquemas basados en platino, con distintos resultados.

Ante estos datos, se realiza un metaanálisis (Non small-cell Lung Cancer Collaborite Group, 1995) que comprendía 14 ensayos, con 4357 pacientes. En aquellos ensayos que utilizaban regímenes basados en cisplatino, se observó una reducción del 13% en el riesgo de muerte, lo que supone un incremento absoluto del 5% en la supervivencia, aunque el resultado no era estadísticamente significativo.

La quimioterapia adyuvante no se convirtió en una práctica habitual, pero los resultados del metaanálisis suscitaron un gran interés, y se iniciaron distintos estudios para clarificar el papel de la quimioterapia adyuvante basada en platino.

The North American Intergroup trial INT 0115 (Keller y cols., 2000) aleatorizó a los pacientes con estadio II a IIIA a recibir tras cirugía, radioterapia o quimiorradioterapia, con Cisplatino-Etopósido. No hubo diferencias en supervivencia global ni en supervivencia libre de recaída. Se describió más toxicidad en el brazo de la concurrencia.

The Adjuvant Project Italy / ALPI (Scagliotti y cols, 2003) reclutó 1209 pacientes con estadios I a IIIA y los randomizó a cirugía o cirugía más quimioterapia según esquema MVP (mitomicina, vindesina, cisplatino) por tres



ciclos. Se administraba Radioterapia según el criterio del clínico. No hubo diferencias significativas en supervivencia global.

The Internacional Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT, 2004) examinó el papel de la quimioterapia con Cisplatino más etopósido o un alcaloide de la vinca, en 1867 pacientes con estadios I- IIIA. Estos pacientes tras la cirugía eran randomizados a recibir 4 ciclos de quimioterapia, frente a observación. La radioterapia era opcional. En el brazo de la quimioterapia se observó un incremento en la supervivencia global a los 5 años del 4.1% y en la supervivencia libre de enfermedad, estadísticamente significativo. Fue el primer estudio prospectivo randomizado que demostró ventajas en supervivencia para la quimioterapia adyuvante.

El estudio del National Cancer Institute of Canada JBR 10 (Winton y cols., 2005) reclutó 482 pacientes con estadios IB y II. Comparaba cirugía versus cirugía más QT adyuvante con Cisplatino-Vinorelbina. Encontraron un beneficio absoluto en supervivencia del 15% a los 5 años.

El estudio del Cancer and Leukemia Group B/ CALGB (Strauss y cols., 2004) randomiza 344 pacientes con estadio IB a recibir o no tras la cirugía, 4 ciclos de Paclitaxel -Carboplatino. Encuentra un beneficio en supervivencia del 12% y una reducción de muerte por CP del 15 al 26%, a los 3 años. Sin embargo tras un seguimiento más largo de este estudio este beneficio ha perdido la significación estadística. Un análisis por subgrupos muestra que el incremento de supervivencia se mantiene estadísticamente significativo en pacientes con tumores mayores de 4 centímetros

El estudio Adjuvant Navelbina Internacional Trialist Association /ANITA 1 (Douillard y cols., 2006) también ha estudiado el papel de la quimioterapia adyuvante con Cisplatino-Vinorelbina. Se ha reclutado 840 pacientes con estadios IB- IIIA. Ha concluido que la quimioterapia produce un beneficio en supervivencia global, estadísticamente significativo, en los estadios II y IIIA, pero no en los estadios IB. El estudio ANITA 2 está dirigido a pacientes que no pueden recibir cisplatino. Randomiza a los pacientes a recibir Vinorelbina adyuvante versus un brazo de observación

El estudio japonés de Kato y cols. (2004) randomizó a 1000 pacientes con Adenocarcinoma estadio I a recibir UFT oral durante 2 años, versus un brazo

de observación. Se encontró beneficio en supervivencia global en el brazo de la adyuvancia, si bien se considera que los resultados no se pueden extrapolar a la población caucásica.

En la actualidad hay estudios en marcha.

<b>ESTUDIO</b>	<b>Esquema de QT</b>	<b>N</b>	<b>Resultados</b>
<b>INT 0115</b>	VP16-P x 4	462	Negativo
<b>ALPI</b>	MVP x 3	1209	Negativo
<b>NCIC</b>	VNR-P x 4	482	Positivo
<b>IALT</b>	P- alcaloide vinca x 3-4	1867	Positivo
<b>ANITA 1</b>	VNR-P x 4	840	Positivo
<b>CALGB 9633</b>	Paclitaxel-Carbo x 4	344	Negativo

**Tabla 9.** Estudios de quimioterapia adyuvante.

#### ○ **RADIOTERAPIA POSTOPERATORIA**

Un metaanálisis (PORT Meta-analysis Trialist Group, 1998) publicado en 1998, que incluía estudios que valoraban el papel de la Radioterapia postoperatoria, mostró un incremento del riesgo relativo de muerte de 21%, para el grupo de pacientes que recibía Radioterapia postoperatoria.

Por tanto, en la actualidad no se recomienda la administración rutinaria de Radioterapia tras cirugía. Se debe valorar cuando tras la cirugía los márgenes están infiltrados por el tumor.

#### ○ **QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

Otra opción de tratamiento, menos explorada, sería la administración de quimioterapia neoadyuvante.

En este sentido, el estudio fase II Bimodality Lung Oncology Team/BLOT (Pisters y cols., 2000) evaluó en 94 pacientes con estadio IB, II y IIIA- T3N1 el papel del tratamiento preoperatorio con Paclitaxel -Carboplatino. La tasa de respuestas fue del 53%. El 94% de los pacientes se intervinieron tras la

quimioterapia, realizando resección completa en el 86% de los casos. La supervivencia a los 5 años fue del 45%.

Esta es la base del estudio SWOG 9900 que comparó tres ciclos de Paclitaxel-Carboplatino y cirugía, versus cirugía sólo (Pisters y cols., 2005). Se cerró con tan solo 354 incluidos. Está pendiente de resultados definitivos, aunque no parece haber diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global.

El estudio Ch.E.S.T. (Scagliotti, 2005) incluye 236 pacientes, que son aleatorizados a cirugía versus quimioterapia con Cisplatino- Gemcitabina seguida de cirugía. No parece haber diferencias significativas entre los dos brazos.

Estos dos últimos estudios se han cerrado prematuramente debido a que los resultados de los estudios de adyuvancia hacía poco ético el brazo de la cirugía sola.

En la actualidad, distintos centros españoles participan en el estudio NATCH, en el que 628 pacientes se randomizan a 3 brazos: cirugía versus quimioterapia neoadyuvante por tres ciclos y cirugía, versus cirugía y tres ciclos de quimioterapia adyuvante. El esquema de quimioterapia empleado es Paclitaxel-Carboplatino.

## ○ **CONCLUSIONES**

Con los datos actuales, se concluye que la quimioterapia adyuvante basada en Cisplatino debe ser el estándar tras la cirugía en los estadios II y IIIA, basándonos en los resultados de tres estudios recientes (IALT, Br10/NCIC, ANITA)

El papel de la adyuvancia en los estadios IB es más controvertido, a raíz del estudio del CALGB y el análisis de subgrupos del BR 10 y ANITA. Algunos pacientes podrían beneficiarse del tratamiento adyuvante con Paclitaxel-Carboplatino cuando la lesión es mayor de 4cm

### **7.3. TRATAMIENTO EN LOS ESTADIOS III.**

Los pacientes con estadio III componen un grupo muy heterogéneo. Constituyen aproximadamente la mitad de los casos. Sin embargo no existe un tratamiento estándar bien definido. Debe realizarse un abordaje individualizado y multidisciplinar, ya que en la mayoría de los casos se usará 2 de las 3 armas disponibles: Cirugía, Radioterapia, Quimioterapia.

Podemos distinguir estas situaciones:

#### **7.3.1. CPCNP Estadio III Resecable.**

La definición de una enfermedad resecable va a depender en gran medida del punto de vista del equipo de cirujanos. El estadio IIIA se considera potencialmente resecable y el IIIB generalmente se cataloga como no quirúrgico.

La QT de inducción se ha estudiado ampliamente en el estadio IIIA y es aceptada en la práctica médica habitual, asumiendo su beneficio en supervivencia global, el aumento de resecabilidad del tumor y el tratamiento precoz de la enfermedad micrometastásica.

Sin embargo, es muy difícil extraer una conclusión de los distintos estudios realizados, ya que se utilizan distintos regímenes de quimioterapia, diferente forma de estadiar el mediastino, y la Radioterapia suele ser opcional.

La importancia pronóstica de la afectación N2 está claramente establecida. Es necesario distinguir los pacientes con tumores IIIA con afectación ganglionar microscópica, con supervivencia a los 5 años del 24-40% tras cirugía, y los pacientes con afectación ganglionar N2 macroscópica (visible por TAC), cuya supervivencia a los 5 años tras cirugía es menor del 10%.

En los años 90 se desarrollaron tres ensayos que estudiaron el papel de la QT neoadyuvante con un número de pacientes pequeños pero con resultados concluyentes y favorables al brazo de la QT (Tabla 10).

<b>ENSAYOS Y BRAZOS</b>	<b>N</b>	<b>MEDIANA SUPERVIVENCIA (meses)</b>	<b>DE</b>	<b>SUPERVIVENCIA A LOS 2 AÑOS (%)</b>
<b>Pass</b>				
• <b>Cx</b>	14	16		29
• <b>QT + Cx</b>	13	29		63
<b>Rosell</b>				
• <b>Cx</b>	30	8		10
• <b>QT + Cx</b>	30	26		37
<b>Roth</b>				
• <b>Cx</b>	32	11		34
• <b>QT + Cx</b>	28	64		50

**Tabla 10.** Estudios de quimioterapia neoadyuvante. (Adaptado de West y cols., 2005).

Sin embargo estos resultados no se han confirmado en 2 estudios más recientes.

El estudio de Depierre y cols. (2002) aleatoriza 345 pacientes con estadios IB-IIIa a cirugía sólo vs 2 ciclos de QT con mitomicina, ifosfamida y cisplatino, antes y después de la cirugía. Los resultados mostraban una tendencia hacia la mejoría de la supervivencia libre de enfermedad y en la reducción de aparición de metástasis en el brazo de tratamiento, pero no diferencias significativas en supervivencia global.

Un análisis posterior demuestra mejoría significativa de supervivencia en los estadios N0 o N1, pero no en N2. Un segundo estudio por el mismo grupo mostró aumento de supervivencia global en los pacientes con afectación N2 macroscópica, pero no en la afectación N2 microscópica.

El otro estudio es el del Grupo Cooperativo Oncológico Japonés 9202 (Nagai y cols., 2003) que comparaba cirugía vs QT con cisplatino- vindesina por 3 ciclos seguida de cirugía. Este estudio se cerró prematuramente por problemas de reclutamiento, y no demostró beneficio en el brazo de la QT de inducción.

Así, el papel de la quimioterapia de inducción en los pacientes con estadio IIIA resecable no está claramente establecido y son necesarios más estudios. Se han realizado estudios fase II que incorporan los fármacos de tercera generación, con resultados prometedores.

Otra controversia es si la Radioterapia puede sustituir a la cirugía en los estadios IIIA.

Para intentar responder a esta pregunta, se han diseñado 2 estudios.

El estudio de la EORTC 08941 (Van Meerbeeck y cols., 2005), reclutó 572 pacientes con estadio IIIA. Se administraban 3 ciclos de un esquema con cisplatino. Los 333 pacientes que respondieron fueron randomizados a cirugía con radioterapia opcional o radioterapia sola. Con una mediana de seguimiento de 58 meses no se han detectado diferencias significativas en supervivencia global (16,4 vs 17,5 meses) ni en supervivencia a los 2 y 5 años (35 y 16% vs 41 y 23%).

El estudio Intergroup 0139/ SWOG (Albain y cols., 2003) incluye 429 pacientes con estadios IIIA y IIIB. Compara un brazo de Radioterapia 45Gy concomitante con Cisplatino-Etopósido seguida de cirugía frente a Radioterapia 61 Gy concomitante con Cisplatino- Etopósido. En ambos brazos después del tratamiento se administraban dos ciclos de quimioterapia con el mismo esquema de cisplatino- Etopósido. La supervivencia libre de progresión fue mayor en el grupo de la cirugía (12,8 vs 10,5 meses) pero ni la supervivencia global (23,6 frente a 22,2 meses) ni la supervivencia a los 5 años (27 vs 20%) alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. En el análisis por subgrupos si se detectó un beneficio en supervivencia para el grupo de cirugía que eran sometidos a lobectomía.

El estudio GLCCG (Ruebe y cols., 2004), con 558 pacientes con estadios IIIA y IIIB, ha comparado la secuencia quimioterapia, quimiorradioterapia y cirugía con quimioterapia, cirugía y radioterapia. No se han observado diferencias en supervivencia a los 3 años (26 vs 25%) ni en supervivencia libre de enfermedad (18 vs 20%). Sin embargo si se ha observado un aumento de toxicidad en el primer brazo, por lo que los autores concluyen que la radioterapia como tratamiento de inducción no aporta beneficio y si aumento de toxicidad.

Por tanto, la secuencia de tratamiento no está claramente establecida, aunque la tendencia actual es la administración de quimioterapia neoadyuvante.

La quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía logra un 15-20% de supervivientes a los 5 años.

Los pacientes con afectación ganglionar voluminosa probablemente se beneficien de quimiorradioterapia, sin cirugía.

<i>estudio</i>	<i>n</i>	<i>estadio</i>	<i>esquema</i>	<i>SPV</i> <i>3años %</i>	<i>SG</i> <i>(meses)</i>
<b>EORTC 0894</b>	33	IIIA	QT x3 → Cx±RT	16	6.4
	3		QT x3 → RT	13	17.5
<b>INT 0139</b>	42	IIIA-B	QT+RT → Cx	27	23.6
	9		QT+RT → RT	20.3	22.2
<b>GLCCG</b>	55	IIIA-B	QT+RT(hf) → Cx	26	
	8		QT+Cx → RT	25	

**Tabla 11.** Estudios de quimiorradioterapia vs quimiorradioterapia y cirugía en estadios III. (Feliu y cols., 2006).

### 7.3.2. CPCNP Estadio III No Resecable.

Hay que diferenciar en este grupo los pacientes con derrame pleural, que tienen un pronóstico semejante a los pacientes con estadio IV, y su tratamiento debe ser similar, y basarse en quimioterapia paliativa.

En el estadio III no resecable el tratamiento estándar “clásico” ha sido la Radioterapia. Sin embargo la alta frecuencia de recidiva a distancia, suscitó el interés de la QT en estos casos.

El punto de partida fue el estudio del CALGB 8433, de Dillman y cols. Este ensayo randomizó 155 pacientes a recibir RT vs QT de inducción con Cisplatino y Vinblastina seguida de Radioterapia. El resultado de este estudio demostró una mejoría significativa en la supervivencia en el brazo de la QT. La mediana de supervivencia mejoró de 9,7 a 13,8 meses y la supervivencia a los 5 años se incrementó de 6% a 17%.

Otros 2 estudios confirmaron el beneficio de la quimioterapia con esquemas que incluían platino (Tabla 12).

<b>Estudio</b>	<b>N</b>	<b>Esquema</b>	<b>% SPV 3 años</b>	<b>SPV global meses</b>	
<b>Dillman</b>	353	QT-RT-RT	21	13,8	
		RT	14		
<b>Le Chevalier</b>	155	QT-RT	23		9,7
		RT	10		13,2
<b>Sause</b>	452	QT-RT	17		11,4
		RT	11		12
		RThiperfraccionada	14		

**Tabla 12.** Estudios de Quimiorradioterapia vs Radioterapia en estadios IIIB.

También se ha investigado la quimiorradioterapia concomitante frente al tratamiento secuencial. Las ventajas del tratamiento secuencial son la menor toxicidad, y la posibilidad de mantener la intensidad de dosis. El tratamiento concurrente aprovecha el efecto radiosensibilizante de la quimioterapia para potenciar el efecto de la radioterapia.

Se han realizado 4 estudios fase III que comparan el tratamiento secuencial frente al concurrente y 3 de ellos han mostrado mejora de supervivencia con el tratamiento concomitante (Tabla 13).

El estudio japonés (Furuse y cols., 1999) comparó Radioterapia concurrente con quimioterapia según esquema MVP (mitomicina, vindesina, cisplatino) versus el mismo esquema de quimioterapia seguido de Radioterapia, en 320 pacientes con CPCNP estadio III irresecable. Los resultados en tasa de respuestas y supervivencia fueron superiores en el brazo de la concurrencia.

El estudio francés (Fournel y cols., 2005) compara Radioterapia concomitante con quimioterapia con Cisplatino- Etopósido seguida de dos ciclos de Cisplatino- Vinorelbina; versus Cisplatino-Vinorelbina por tres ciclos, seguida de Radioterapia. En este estudio aunque existe una tendencia a mayor supervivencia en el brazo de la concurrencia, el resultado no es



estadísticamente significativo. Quizás esto se deba al bajo reclutamiento de este ensayo.

El estudio de la RTOG 9410 (Curran y cols.), aleatoriza 610 pacientes a tres brazos: Radioterapia concurrente con quimioterapia, quimioterapia y Radioterapia secuencial, y, Radioterapia hiperfraccionada y quimioterapia concomitante. Se utilizó el regimen Cisplatino- Vinblastina en los brazos del tratamiento secuencial y concomitante; y, Cisplatino-Etopósido en el brazo de la Radioterapia hiperfraccionada. La supervivencia global fue significativamente mayor en el brazo de la concurrencia.

Por tanto el tratamiento concurrente mejora la tasa de respuestas y la supervivencia, respecto al tratamiento secuencial, y es el estándar en pacientes con CPCNP estadio III irresecable, con buen performans estatus y mínima pérdida de peso.

<i>Estudio</i>	<i>Brazos</i>	<i>Mediana de supervivencia (meses)</i>	<i>Supervivencia a los 4 años %</i>
<b><i>Furuse</i></b>	Concurrente	16.5	16.9
	Secuencial	13.3	10.1
<b><i>Fournel</i></b>	Concurrente	15	35
	Secuencial	13.8	23
<b><i>Curran</i></b>	Concurrente	17	21
	Secuencial	14.6	12
	Concurrente hiperfraccionada	15.2	17

**Tabla 13.** Estudios de quimiorradioterapia concurrente vs secuencial en estadio IIIB.

Otra estrategia terapéutica sería la quimioterapia antes o después del tratamiento concurrente. Estudios fase II arrojan resultados prometedores pero son necesarios estudios fase III.

#### **7.4. TRATAMIENTO EN LOS ESTADIOS IV Y IIIB CON DERRAME PLEURAL/ PERICÁRDICO MALIGNO.**

En esta situación el objetivo del tratamiento es la paliación. La evidencia científica actual apunta a que el mejor tratamiento de soporte es la quimioterapia. El tratamiento sistémico ha demostrado beneficio en incrementar la supervivencia, disminuir los síntomas e incrementar la calidad de vida en estos pacientes (Spiro y cols., 2004).

El CPCNP estadio IV comienza a tratarse en los años sesenta con agentes clásicos como cisplatino, carboplatino, mitomicina, ifosfamida, vinblastina, etopósido o adriamicina, con escasa actividad en monoterapia. Sin embargo las combinaciones con cisplatino obtenían una tasa de respuestas entre 10-25% y una mediana de supervivencia de entre 23 y 25 semanas.

Los estudios realizados con estos fármacos obtienen resultados variables. En 1995 se publica el metaanálisis del Non –Small Lung Cancer Collaborative Group con un total de 778 pacientes, procedentes de 8 ensayos aleatorizados, en los que se compara quimioterapia basada en platino frente al mejor tratamiento de soporte, Demuestra beneficio para la quimioterapia con un aumento de la calidad de vida, un incremento de la mediana de supervivencia de 1,5 meses, una mejoría absoluta de la supervivencia a 1 año del 10%.

Estudios aleatorizados posteriores han confirmado este beneficio en supervivencia y calidad de vida, y además apuntan que la QT es costo-efectiva.

Asimismo aparece una nueva generación de agentes con mayor eficacia como gemcitabina, vinorelbina, taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II. Estos fármacos en combinación con platino proporcionan una tasa de respuestas del 25-50%, una mediana de supervivencia de 8-10 meses y una supervivencia al año de hasta el 40% (López Vivanco, 2005).

La cuestión que se plantea es la combinación de citostáticos a utilizar. En este sentido, en ASCO del 2000 se presenta el estudio ECOG 1594 (Schiller y cols., 2002) que compara las combinaciones de fármacos más prometedoras. Este trabajo incluye 1100 pacientes con CPCNP, estadios IIIB con derrame pleural y estadio IV. Se aleatorizan a recibir tratamiento según 4 esquemas:

Brazo A Cisplatino- Paclitaxel; Brazo B Cisplatino- Gemcitabina; Brazo C Cisplatino-Taxotere; Brazo D Carboplatino- Paclitaxel. Los cuatro esquemas obtienen un índice de respuestas similar, sin diferencias en supervivencia, por lo que se concluye que cualquiera de estos 4 esquemas es válido.

Otros estudios han comparado dobles de platino con fármacos de tercera generación sin encontrar diferencias significativas en supervivencia (Tabla 13).

Un metaanálisis publicado en 2005 (Le Chevalier y cols.) detecta un pequeño beneficio a favor de la combinación de Cisplatino-Gemcitabina.

<i>estudio</i>	<i>tratamiento</i>	<i>Mediana supervivencia (meses)</i>	<i>Supervivencia 1 año (%)</i>	<i>p</i>
<b>Kelly</b>	Cis/vinorelbina	8.1	36	ns
	Carbo/Paclitaxel	8.6	38	
<b>Van</b>	Cis/Paclitaxel	8.1	32.5	ns
<b>Meerbeeck</b>	Cis/Gemcitabina	8.8	32.6	
<b>Schiller</b>	Cis/Paclitaxel	7.8	31	ns
	Cis/Gemcitabina	8.1	36	
	Cis/Docetaxel	7.4	31	
	Carbo/Paclitaxel	8.1	34	
<b>Scagliotti</b>	Cis/Gemcitabina	9.8	37	ns
	Carbo/Paclitaxel	9.9	43	
	Cis/Vinorelbina	9.5	37	
<b>Fosella</b>	Cis/Vinorelbina	10.1	41	0.044
	Cis/Docetaxel	11.3	46	
	Carbo/Docetaxel	9.4	38	
<b>Gebbia</b>	Cis/Vinorelbina	9.0	20	ns
	Cis/Gemcitabina	8.2	24	

**Tabla 13.** Estudios comparativos de dobles de platino en estadio IV. (Felip y cols., 2007).

Por tanto, en la actualidad se asume como tratamiento de elección cualquiera de estos regímenes, basados en platino y un fármaco de nueva generación.

- Quimioterapia de 2ª línea.

Otra cuestión es la quimioterapia de 2º línea.

El tratamiento de segunda línea se puede considerar en pacientes con buen PS que presenten una recaída tras QT basada en platino. En el momento actual hay dos fármacos citotóxicos aprobados en esta situación: Docetaxel y Pemetrexed; y un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico, Erlotinib.

Los agentes quimioterápicos más estudiados han sido docetaxel, pemetrexed, paclitaxel, vinorelbina y gemcitabina, con un índice de respuestas que oscila entre 0-20%.

El estudio TAX 317 (Shepherd y cols., 2000) comparó Docetaxel en monoterapia frente al mejor tratamiento de soporte, en pacientes con CPCNP estadio IV que hubiesen recibido una primera línea con cisplatino. Los resultados muestran un beneficio para docetaxel con un incremento en la supervivencia y en la calidad de vida.

El estudio TAX 320 (Fosella y cols., 2000) comparó, como tratamientos de 2ª línea, docetaxel frente a vinorelbina o ifosfamida, con resultados de supervivencia a favor de docetaxel.

Esto lleva a que docetaxel se apruebe como tratamiento de 2º línea en el CPCNP metastásico.

Pemetrexed ha sido comparado con Docetaxel en el estudio de Hanna y cols. (2004), obteniendo resultados similares, pero con un perfil de toxicidad mejor.

- Nuevos fármacos diana

A pesar de los esfuerzos terapéuticos realizados, el incremento de supervivencia conseguido en el CPCNP estadio IV es muy escaso, y la mediana de supervivencia de estos pacientes ronda los 7-9 meses.

Los nuevos enfoques incluyen agentes frente a dianas moleculares, principalmente inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como Erlotinib y Gefitinib; y, anticuerpos monoclonales contra distintos receptores.

Las pequeñas moléculas inhibidoras del EGFR, Erlotinib y Gefitinib, consiguen en segunda línea un 10% de respuesta. Esta tasa de respuestas no supera al logrado con la quimioterapia. Por tanto se trata de identificar al subgrupo de pacientes que se beneficia de esta terapia dirigida. De hecho, distintos estudios demuestran mayor eficacia en adenocarcinomas, sobre todo si tiene elementos bronquioloalveolares, mujeres, no fumadores, asiáticos, y lo más importante, tumores que presenten mutaciones en el EGFR. Las respuestas podrían estar relacionadas con una mutación alrededor del dominio de la tirosina cinasa del receptor EGFR y con la ausencia de las mutaciones K-RAS.

Un estudio fase II con Erlotinib en pacientes con CPCNP estadio IV, tratados previamente con platino, obtiene una tasa de respuesta objetiva de 12%. Además muestra que Erlotinib prolonga la supervivencia en comparación con un placebo. En dicho estudio con 731 pacientes, la supervivencia general media fue de 6,7 meses comparado con 4,7 meses. En 2004 se presenta en la ASCO el estudio fase III BR-21 (Shepperd y cols.) en pacientes con CPCNP estadio IV con progresión a platino, que compara Erlotinib versus tratamiento de soporte. Los resultados fueron superiores en el brazo de tratamiento con Erlotinib.

Así, la FDA aprobó Erlotinib para pacientes con CPCNP metastásico con progresión a un esquema de quimioterapia.

Además se puede utilizar en primera línea en pacientes que presentan mutación en EGFR.

Hay dos estudios en primera línea, en combinación con quimioterapia (TALENT, TRIBUTE), en los que la adición de Erlotinib no ha mejorado los resultados de la quimioterapia sola.

Gefitinib en dos estudios fase II, IDEAL 1 y 2, produce respuestas entre el 9% y 19% en pacientes con CPCNP tratados previamente con esquemas de quimioterapia con platino. Sin embargo, un estudio fase III que evalúa gefitinib versus placebo en 1692 pacientes con NSCLC previamente tratados muestra que gefitinib no mejora la supervivencia. En dos estudios fase III, INTACT 1 y 2, que evalúan el papel de Gefitinib en combinación a la quimioterapia basada en platino, muestra que la adición de Gefitinib no mejora los resultados.

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea el factor de crecimiento vasculo-endotelial. En un estudio fase II/III (ECOG 4599; Sandley y cols.), con 842 pacientes con CPCNP avanzado no epidermoide, la combinación Bevacizumab con Paclitaxel y Carboplatino, resultó ser superior en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, frente a Paclitaxel – Carboplatino. La toxicidad en el brazo de Bevacizumab fue significativamente superior. La FDA a raíz de este estudio ha aprobado en el 2006, Bevacizumab, en combinación con Paclitaxel – Carboplatino, para pacientes con CPCNP no epidermoide, localmente avanzado o metastásico. En este sentido, otro estudio (estudio AVAiL) que compara el esquema Cisplatino-Gemcitabina solo o en combinación con bevacizumab en pacientes con CPCNP no escamoso ha confirmado la superioridad del régimen con Bevacizumab.

- **Quimioterapia en pacientes ancianos**

La media de edad a la que se diagnostica el CPCNP es 68 años. Cerca del 60% de los pacientes tiene más de 65 años y entre el 30-40% es mayor de 70 años. El porcentaje de pacientes ancianos que recibe quimioterapia se reduce por 3 razones: comorbilidad asociada a la edad; miedo a que la población anciana sea más susceptible a los efectos secundarios de la QT; falta de estudios dirigidos a esta población (Feliu y cols., 2006).

Estudios retrospectivos (Langer y cols., 2001; Bashe y cols., 2004) y un metaanálisis (Earle y cols., 1999) muestra que la QT no es más tóxica en ancianos y obtiene un beneficio similar que en los otros grupos de edad.

Se han realizado varios estudios fase III (Gridelli y cols., 2005) dirigidos a estudiar la eficacia de la QT en ancianos, generalmente empleando esquemas de monoterapia o combinaciones sin cisplatino.

Sin embargo, en pacientes ancianos con buen performance status y sin patología asociada importante, debe valorarse la administración de dobletes con platino.

Por tanto el enfoque terapéutico del CPCNP requiere de una valoración geriátrica global con el fin de individualizar cada caso.

#### **7.5. CONCLUSIONES GENERALES DEL TRATAMIENTO.**

- Se ha demostrado que la quimioterapia adyuvante en los estadios II- IIIA mejora la supervivencia.
- En los pacientes estadios IIIB sin derrame el tratamiento de elección es la quimiorradioterapia concurrente.
- La quimioterapia en estadios IIIB con derrame y IV mejora la calidad de vida y produce un modesto incremento de la supervivencia. El esquema de elección es un doblete que contenga platino, durante 4-6 ciclos.
- Los pacientes ancianos y/o ECOG 2 se pueden beneficiar de quimioterapia paliativa.
- La quimioterapia de segunda línea en la enfermedad metastásica ofrece un beneficio en pacientes que mantienen un buen estado general.

<b>ESTADIO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
<b>ESTADIO I</b>	Cirugía
<b>ESTADIOS II</b>	Cirugía y Quimioterapia adyuvante
<b>ESTADIO IIIA</b>	Cirugía si es posible. Quimioterapia adyuvante/ neoadyuvante

<b>ESTADIO IIIB</b>	Radioterapia y Quimioterapia concomitante
<b>ESTADIO IV</b>	Quimioterapia/ Nuevos agentes diana

**Tabla 14.** Conclusiones generales del tratamiento.

## 8. SCREENING PARA EL CPCNP.

El CP constituye la primera causa de muerte por cáncer, entre otras causas, porque habitualmente se diagnostica en estadios avanzados en los que la eficacia del tratamiento es menor. Se han realizado numerosas investigaciones para introducir el screening de CP con la intención de conseguir un diagnóstico precoz de la enfermedad y así poder aplicar tratamientos más eficaces, lo que supondría una mejoría en el pronóstico de esta enfermedad (Wardwell y Massion, 2005).

Desafortunadamente, ninguna estrategia de screening ha demostrado beneficio en reducir la mortalidad por CP, y en la actualidad no se recomienda el cribado de CP. No obstante, continúa el interés por encontrar un método que permita el diagnóstico precoz. Los esfuerzos se centran en nuevas técnicas como la tomografía espiral de baja exposición, la broncoscopia autofluorescente y el análisis de esputo con técnicas avanzadas (Ashton y Jett, 2005). En el momento actual hay estudios aleatorizados en curso cuyo objetivo principal es demostrar disminución de mortalidad por CP. Por ello, los individuos interesados en ser sometidos a cribado deben ser invitados a participar en ensayos clínicos.

## 9. FACTORES PRONÓSTICO.

El CPCNP es una enfermedad muy heterogénea con una gran variabilidad interindividual (Garrido y cols., 2006). Generalmente cuando se diagnostica se trata de una enfermedad avanzada sin posibilidad de curación. La mayoría de los pacientes son subsidiarios de tratamiento quimioterápico. Es



importante la individualización del tratamiento de acuerdo con unos factores pronóstico. No hay un consenso en este aspecto.

La Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón estableció en 1996 (Feld y cols., 1997) tres factores pronóstico: el estadio según la clasificación TNM, estado general, y pérdida de peso. Cataloga como variables con valor predictivo sexo, edad, histología, niveles de LDH, albúmina, hemoglobina, plaquetas y leucocitos.

La ASCO (American Society of Clinical Oncology) considera 2 factores pronóstico (Pfister y cols., 2004): estadio TNM y performance estatus, considerando otros puntos como importantes: pérdida de peso, sexo, niveles de LDH y afectación ósea o hepática.

Podemos distinguir factores pronóstico dependientes del tumor y otros dependientes del paciente (Tabla 15).

<b>FACTORES DEPENDIENTES DEL PACIENTE</b>	<b>edad</b>	<b>sexo</b>	<b>Estado general</b>	<b>Pérdida de peso</b>	<b>Datos analíticos</b>
<b>FACTORES DEPENDIENTES DEL TUMOR</b>	<b>Estadio TNM</b>	<b>biología</b>			

**Tabla 15.** Factores pronóstico.

### 9.1. FACTORES PRONÓSTICO DEPENDIENTES DEL PACIENTE.

- **EDAD**

Más del 50% de los pacientes con CPCNP es mayor de 60 años, y el 30% de los casos es mayor de 70 años. La incidencia y mortalidad ha disminuido en menores de 50 años y aumentado en mayores de 70 (Wingo y cols., 2003).

Sin embargo los estudios realizados a menudo han excluido a los pacientes ancianos, por lo que es difícil establecer el tratamiento adecuado. La edad biológica no se considera un factor pronóstico independiente, aunque sigue siendo un tema controvertido. No hay que olvidar que la edad avanzada se asocia a mayor comorbilidad que condiciona en ocasiones la administración del tratamiento adecuado.

- SEXO

El sexo masculino ha resultado ser un factor pronóstico adverso en distintos estudios.

El CPCNP parece tener un comportamiento biológico diferente en las mujeres. La tasa de supervivencia a los 5 años es superior en las mujeres en todos los estadios (Alexiou y cols., 2002).

- ESTADO GENERAL

El estado general es un factor pronóstico de gran relevancia en la mayoría de los tumores sólidos. Se utilizan dos escalas fundamentalmente: ECOG (Tabla 16) y Karnofsky, que pueden equipararse.

Los estudios realizados en los distintos estadios de la enfermedad confirman que el estado general es uno de los factores pronóstico de más peso (Jiroutek y cols., 1998).

---

E.C.O.G.	
0	Asintomático. Totalmente activo.
1	Restricción actividad intensa. Capaz de trabajo ordinario
2	Ambulatorio y capaz de autocuidados. Incapaz para trabajar. Levantado más del 50% del tiempo despierto.
3	Capaz de algún autocuidado. Vida cama-sillón más del 50% del tiempo despierto.
4	Incapacidad total. Silla-cama el 100% del tiempo despierto.
5	Muerto

---

**Tabla 17.** Clasificación ECOG

- **PERDIDA DE PESO**

La pérdida de peso los 6 meses previos al diagnóstico es considerado como un factor pronóstico por algunos autores. En los pacientes con estadio III este punto está más establecido y no se recomienda el tratamiento combinado por la alta toxicidad observada y el impacto negativo en la supervivencia (Pfister y cols., 2004).

- **DATOS ANALÍTICOS**

Los datos analíticos que más se han considerado en los estudios son los niveles de Hemoglobina y LDH. Otros factores estudiados y con alguna relevancia, han sido la albúmina, fosfatasa alcalina, leucocitos y calcio.

El más interesante es la Hemoglobina por la posibilidad de tratamiento. Sin embargo los estudios realizados con agonistas de los receptores de eritropoyetina han arrojado resultados contradictorios, por lo que su uso se limita a las indicaciones de las guías terapéuticas (Bokemeyer y cols., 2004).

## **9.2. FACTORES PRONÓSTICO DEPENDIENTES DEL TUMOR.**

- **ESTADIO TNM**

La clasificación TNM permite agrupar los pacientes en grupos homogéneos y establecer un pronóstico, ya que cada estadio tiene una correlación clara con la supervivencia.

Sin embargo esta clasificación no está exenta de críticas (Garrido y cols., 2006).

El estadio III incluye pacientes muy diferentes. Distinguimos 2 subestadios IIIA y IIIB, con distinto enfoque terapéutico y pronóstico. Además dentro del estadio IIIA hay situaciones tan diferentes como T3N1 y afectación ganglionar N2. Asimismo hay que distinguir entre una afectación N2 microscópica y afectación N2 voluminosa.

También el estadio IV agrupa pacientes muy diferentes, en relación al número y localización de las metástasis.

- **FACTORES BIOLÓGICOS**

El estudio genómico y proteómico de los tumores trata de establecer unos perfiles moleculares que permitan determinar el pronóstico y seleccionar la mejor estrategia terapéutica.

El CPCNP es de los más estudiados. Pero todavía está en fase de investigación y en la actualidad no se conoce con exactitud la repercusión de los cambios citogenéticos que conocemos (Garrido y cols., 2006).

## **10. ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL CPCNP.**

La tumorigénesis es el proceso por el cual los eventos genéticos se acumulan en el tiempo provocando la transformación maligna de la célula. Se estima que son necesarias 10-20 alteraciones de oncogenes y/o genes supresores para la tumorigénesis del CP. Entre los genes implicados están RAS, p53, gen RB, familia EGFR, MYC, bcl-2, fenotipo mdr.

- **RAS**

La familia RAS incluye K-RAS, H-RAS y N-RAS. Esta familia de genes codifica proteínas de 21 kDa transmembrana implicadas en la transmisión de señales. Se unen a nucleótidos de guanina (GDP o GTP) implicados en procesos intracelulares como la mitosis. La unión de RAS a GTP mantiene a la proteína en estado activo, mientras que la unión a GDP, devuelve la proteína a su estado inactivo. Cuando la proteína RAS se convierte en un oncogen pierde la capacidad de hidrolizar GTP, por lo que la proteína se mantiene activa continuamente, estimulando el crecimiento.

Aproximadamente del 25 al 48% del CPCNP presenta mutación en RAS, principalmente adenocarcinomas.

El 90% de las mutaciones ocurren en K-RAS y en el codón 12. Además conocemos que generalmente los cambios son de Guanina a Timina.

Estudios in vitro relacionan la exposición a los carcinógenos del humo del tabaco, como benzo-alfa- pireno y N- nitrosamina, con las mutaciones RAS.

Para su activación, K-RAS necesita ser farnesilada por lo que se han realizado estudios con inhibidores de la farnesil-transferasa, sin datos concluyentes.

- MYC

La familia MYC incluye c-MYC, N-MYC y L-MYC. El que con mayor frecuencia está alterado en el CPCNP es el c-MYC, mientras que N-MYC y L-MYC se encuentran alterados en el cáncer microcítico.

El protooncogen c-MYC codifica una proteína de localización nuclear y perteneciente a la familia de factores de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina (bHLHZH). Generalmente la sobreexpresión de c-MYC ocurre por procesos de amplificación génica o activación del promotor.

- Gen p53

El gen p53 es un gen supresor que mantiene la integridad del ADN. Se localiza en el cromosoma 17p. Actúa como factor de transcripción de muchos genes, ejerciendo un papel en la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA, diferenciación, neoangiogénesis y apoptosis.

La inactivación de p53 es la alteración más frecuente en el cáncer humano. Ocurre en más del 50% de los CPCNP (Bennett y cols, 1993).

La inactivación de p53 se debe a una delección de una copia, existiendo una mutación en la otra.

Son más frecuentes en el carcinoma epidermoide y en el CMP. Parece que estas alteraciones están relacionadas con la exposición al humo del tabaco (Hainauty cols., 1996). El papel de las mutaciones de p53 es controvertido pero parece que confiere resistencia al tratamiento quimioterápico.

- Gen p16

El gen p16 regula la función del gen RB e inhibe la actividad cinasa CDK4 y CDK6. p16 puede sufrir la pérdida de un alelo o de ambos, así como la mutación o mutilación de su promotor, de manera que se inactiva su función como gen supresor.

En un 30-50% de los CPCNP se produce la pérdida de función de RB (Chen y cols., 2001), por deleciones o mutaciones, que se traducen en una proteína aberrante.

- Bcl-2

El protooncogen bcl-2 codifica una proteína que inhibe la apoptosis o muerte celular programada. La sobreexpresión de bcl-2 impide la muerte celular.

- Familia EGFR

La familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico tiene 4 miembros. Estos receptores transmembrana constan de un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad tirosin cinasa.

El EGFR está sobreexpresado en un 40-80% de los CP. La homodimerización o heterodimerización de EGFR y la activación de su dominio cinasa son esenciales para la fosforilación de diversas vías señales intracelulares, implicadas en el control celular, la proliferación, la apoptosis y la invasión celular. Por este motivo constituye una diana terapéutica muy interesante.

- Fenotipo mdr

El CPCNP es considerado quimiorrefractario. Esta quimiorresistencia es uno de los principales obstáculos en el tratamiento del CPCNP. Están implicadas 4 familias de proteínas transportadoras: PgP, MRP, BCRP Y LRP, que constituyen el fenotipo multidrug resistance o mdr.

## 11. EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A MULTIPLES DROGAS: Fenotipo MDR.

### 11.1. Fenotipo mdr

Las células tumorales son capaces de desarrollar resistencia a la quimioterapia. Esta resistencia, independientemente de los mecanismos que la produzcan, puede ser intrínseca y estar presente en el momento del diagnóstico; o adquirida, y aparecer durante el curso de la enfermedad neoplásica, a pesar de una respuesta inicial al tratamiento (Beck y Dalton, 2001). La propia cinética de crecimiento tumoral y en relación a ésta la aparición de mutaciones espontáneas está implicada en esta resistencia (Goldie y Coldman, 1979). Así, el número de células resistentes en un tumor en el momento del diagnóstico se relacionará directamente con su tamaño y su tasa de mutación.

Sin embargo, no existe una definición claramente establecida de tumor resistente y hasta el momento no se ha identificado un mecanismo que por sí solo confiera resistencia a todos los fármacos conocidos (Paredes Lario, 2007). Se asume que la resistencia tenga una causa multifactorial (Tabla 18).

La reducción intracelular de los fármacos antineoplásicos es un mecanismo muy frecuente. Esto se produce por su expulsión a través de la membrana plasmática o por secuestro en vesículas citoplasmáticas (Paredes Lario, 2007). Este mecanismo se ha relacionado con la expresión de una serie de proteínas, que constituyen el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos o multidrug resistance o mdr.

El **fenotipo MDR** constituye la mayor causa de fallo en el tratamiento con quimioterapia. Se ha asociado con la expresión de una serie de proteínas: PgP, familia MRP, LRP y BCRP.

La historia de las proteínas mdr se remonta a 1973 cuando Dano descubre la expulsión de daunorrubicina en células tumorales resistentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron la PgP, una glicoproteína en la membrana

plasmática de células resistentes a fármacos que se comportaba como una bomba de expulsión.

	<i>Pasos en la acción de los fármacos quimioterápicos</i>	<i>Alteraciones que conllevan resistencia</i>	<i>Mecanismo de resistencia a fármacos (ej)</i>
1	Entrada del fármaco	Disminución de la acumulación intracelular del fármaco	Proteínas transportadoras (mdr)
2	Activación del fármaco	Inactivación del fármaco	Activación enzimática del sistema glutation, secuestro en vesículas intracelulares
3	unión y/o daño a diana	Alteración de la diana y/o reparación	Mutaciones en genes que codifican topoisomerasas, reparación del ADN
4	Detención del ciclo celular	Inducción de apoptosis	Mutación en p53, activación bcl-2

**Tabla 18.** Principales mecanismos de resistencia de las células tumorales. (Adaptado de Stavrovskaya, 2000).

Los fármacos afectados por la resistencia mdr tienen características comunes: son compuestos de origen natural, lipofílicos, con un peso molecular de entre 300-900Da, que entran en la célula por difusión pasiva. Las proteínas mdr se encuentran en numerosos tejidos sanos y en los tumores que de ellos derivan, principalmente en órganos que tienen una función secretora-excretora, lo que sugiere que estas proteínas protegen de toxinas exógenas.

Las proteínas mdr producen resistencia mediante tres mecanismos principalmente (Paredes y cols., 2006):

- PgP, familia MRP y BCRP, pertenecen a la familia ATP-binding-cassette (ABC) transporters. Los ABC transporters se comportan como bombas de expulsión, y disminuyen la concentración intracelular de distintas sustancias, entre ellas algunos fármacos antineoplásicos.



- LRP, y en menor medida MRP y PgP, se han relacionado con la alteración de la distribución intracelular de compuestos, principalmente por secuestro en vesículas citoplasmáticas.
- PgP parece estar involucrada en la apoptosis.

### 11.1.1. ABC TRANSPORTERS.

**ABC transporters** constituye una superfamilia de proteínas transportadoras, presente en células procariotas y eucariotas. En el genoma humano se han detectado 49 genes ABC, 16 de ellos tienen una función conocida (Dean y cols., 2001).

Estas proteínas se sitúan en la membrana plasmática de las células. Su estructura generalmente consta de 4 dominios: 2 dominios hidrofóbicos transmembrana y 2 dominios hidrofílicos intracelulares, que contienen la bomba de ATP.

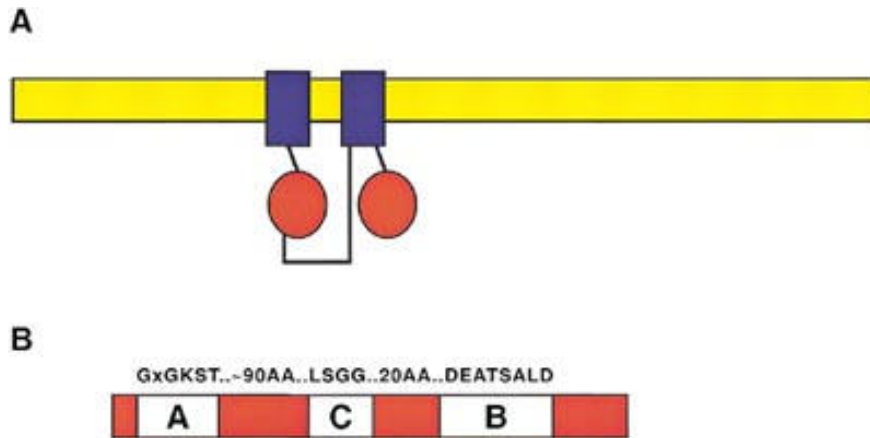
Transportan sustancias en contra de gradiente de concentración, a expensas de la hidrólisis de ATP.

Los dominios transmembrana (TM o MSD) contienen de 6-11 alfa hélices, donde se une el sustrato específico. Los dominios de unión al ATP, también llamados nucleotide-binding fold (NBF o NBD), se localizan en el citoplasma y aportan la energía necesaria para transportar el sustrato a través de la membrana. Contienen dos tipos de dominio: Walker A, que se une a la molécula de ATP; y Walker B que interactúa con nucleótidos asociados a magnesio (Lockhart, 2003).

El transporte generalmente es unidireccional. En el caso de los organismos eucariotas este transporte suele ser desde el citoplasma al exterior de la célula o en compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático, mitocondrias). Sin embargo, en bacterias los ABC transporters permiten la entrada de compuestos esenciales que no pueden obtenerse por difusión (Dean, 2002)

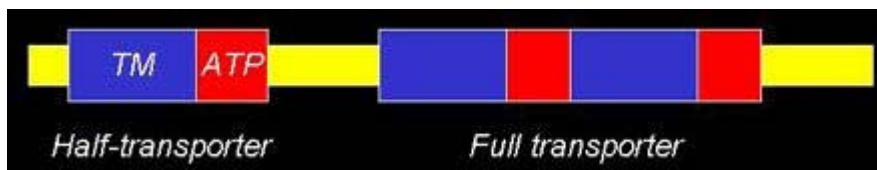
Entre los sustratos de estas proteínas transportadoras se encuentran una gran variedad de compuestos: lípidos, sales biliares, péptidos presentadores de

antígenos, tóxicos endógenos y exógenos, por lo que estas proteínas están implicadas en numerosos procesos fisiológicos.



**Figura 4.** Estructura de los ABC transporters. A: Estructura de los ABC transporters. TM en azul; NBF en rojo; membrana plasmática en amarillo. B Dominio NBF. (Dean y cols., 2002).

En eucariotas, los ABC transporters suelen ser full transporters, es decir, contienen 2 dominios TM y dos dominios NBF. Pero también se presentan como half transporters (Figura 5), cuando solo constan de 1 dominio TM y 1 dominio NBF (Dean, 2002).



**Figura 5.** Half and full transporters.

Los ABC transporters se distribuyen por todo el organismo, pero principalmente en tejidos con importante actividad metabólica y función barrera, como hígado, riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, placenta, testículo, BHE y médula ósea.

En el 2003 se ha publicado un estudio de Langmann y cols. que analiza la expresión de ARN mensajero (ARNm) de ABC transporters en veinte tejidos

diferentes utilizando la técnica de real-time RT-PCR. Concluyen que el grado de expresión varía en los distintos tejidos. Corazón y músculo esquelético presentaron los niveles más bajos. En cambio, los tejidos con mayores niveles detectados fueron tejidos con importante función excretora como glándula adrenal; importante actividad metabólica como hígado; función barrera (pulmón, tráquea) y órganos del sistema reproductivo (próstata, placenta, útero).

Dentro de esta superfamilia se distinguen 7 subfamilias con estructura similar que se denominan desde ABCA hasta ABCG, que a su vez se subdividen.

Se han implicado en la resistencia a la quimioterapia algunos ABC transporters (Tabla 19):

- ABCB2 o glicoproteína P
- ABCC1 o MRP1
- ABCC2 o MRP2
- ABCC3 o MRP3
- ABCC4 o MRP4
- ABCC5 o MRP5
- ABCG2 o BCRP

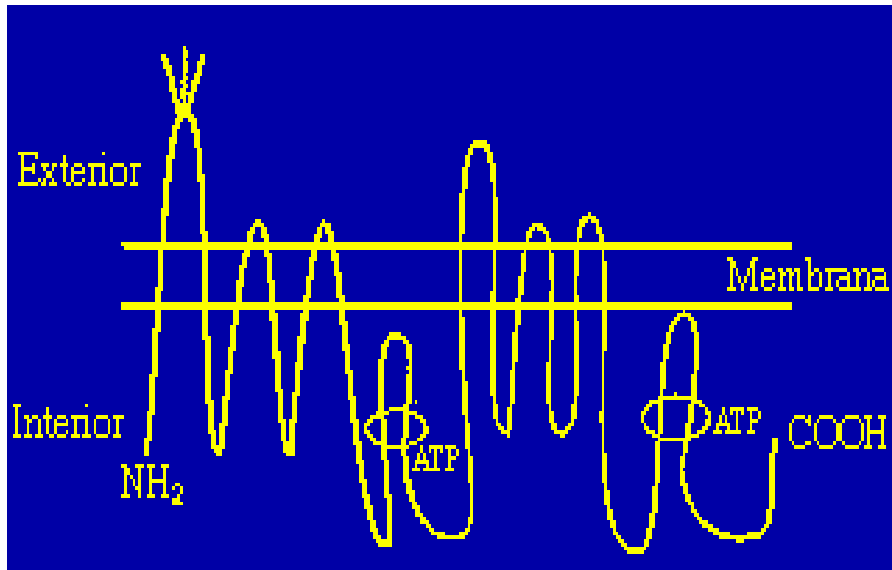
ABC	Otros nombres	Gen	Localización en tejidos	Papel
<b>ABCB1</b>	PGP, PGY1, MDR	7p21	Intestino, colon, hígado, riñón, adrenal, cerebro, testículo, ovario	Resistencia múltiple
<b>ABCC1</b>	MRP1	16p13.1	Pulmón, intestino, colon, eritrocitos	Resistencia múltiple
<b>ABCC2</b>	MRP2	10q24	Hígado, riñón, intestino	Transportador en canalículos de hepatocitos
<b>ABCC3</b>	MRP3	17q21.3	riñón, adrenal, hígado, bazo	Resistencia múltiple
<b>ABCC4</b>	MRP4	13q32	Próstata, pulmón, genitourinario	Transporta análogos de nucleótidos

<b>ABCC5</b>	MRP5	3q27	ubicua	Resistencia a tiopurinas
<b>ABCC6</b>	MRP6	16p13.1	Riñón, hígado	Antraciclinas, epipodofilotoxinas
<b>ABCC11</b>	MRP8	16q12.1	Mama, testículos	Desconocida
<b>ABCC12</b>	MRP9	16q11	Mama, testículos	Desconocida
<b>ABCG2</b>	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Placenta, intestino, hígado, colon	Mitoxantrone, CPT11, topotecan, SN38, metotrexate, antraciclinas

**Tabla 19.** Localización y papel de los ABC transporters implicados en la resistencia a quimioterapia.

### 11.1.2. ABCB1 o Glicoproteína P o PgP.

La glicoproteína P (PgP) fue descubierta por Juliano y Ling en 1976 en la membrana plasmática de células de hámster chino resistentes a colchicina. Se trata de una glicoproteína de 170 kDa, formada por 1280 aminoácidos. Pertenece a la superfamilia ABC-transporters. Es el miembro más estudiado al ser el primero en describirse. Esta proteína transportadora consta de dos mitades homólogas (dímero). Cada dímero presenta seis segmentos transmembrana unidos, dispuestos en tres pares y asociados a un dominio hidrofílico- C- Terminal que contiene la secuencia de unión e hidrólisis del ATP. La secuencia de aminoácidos contiene un segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal (Figura 6). El extremo C- Terminal se sitúa en el lado citoplasmático de la membrana (Ruiz Gómez, 2002).

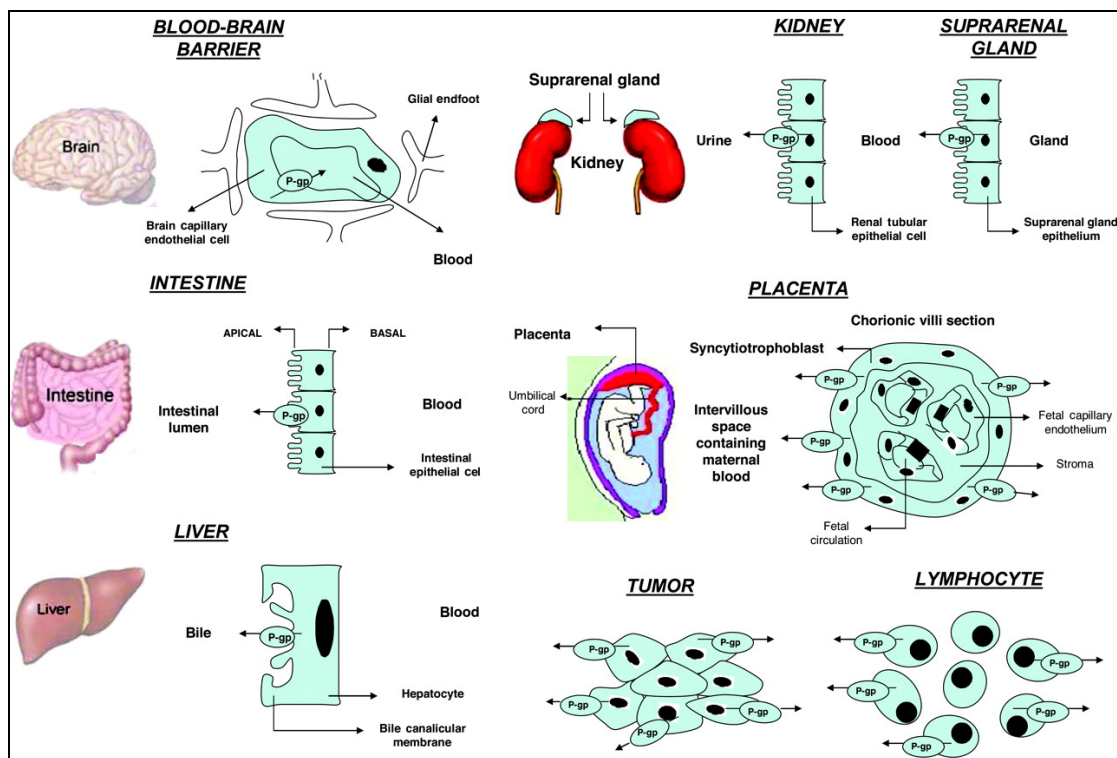


**Figura 6.** Estructura PgP.

La estructura transmembrana de PgP es en forma de canal, mientras los dominios intracelulares de unión e hidrólisis de ATP forman un poro. Así esta proteína actúa como una bomba extrusora dependiente de energía. Cuando un sustrato de alta afinidad se une al sitio ligando, se produce la hidrólisis de la molécula de ATP, causando un cambio configuracional, que traslada el sustrato a un sitio-ligando de menor afinidad, para después ser liberado al espacio extracelular (Sauna y cols., 2001). Por tanto, esta proteína constituye una bomba de flujo capaz de transportar sustancias en contra de gradiente de concentración, a expensas de la hidrólisis de una molécula de ATP .

Cada mitad de la molécula no actúa independientemente, ya que la inactivación de uno o dos puntos de unión e hidrólisis de ATP conlleva la inactivación de la proteína.

Su localización en la membrana apical de células de tejidos excretores como hígado, riñón y glándula suprarrenal; y células de tejidos "barrera" como intestino delgado, colon, BHE, placenta, testículo y ovario, sugieren un papel protector frente a sustancias tóxicas, excretándolas a bilis, orina, o luz intestinal, también impide su acumulación en cerebro y feto, por ejemplo (Figura 7). Asimismo se han detectado niveles altos de expresión en células madre hematopoyéticas (Chaudhary y Roninson, 1991).



**Figura 7.** Distribución de P-gp en el organismo (Marchetti y cols. 2007)

Existen 2 versiones principales, sobre el funcionamiento de P-gp (Ruiz Gómez y cols., 2002).

En la primera teoría, la unión de la droga a P-gp sería reversible, y la droga es eliminada a la superficie celular. La transfección de ADN de P-gp a células sensibles a quimioterapia da lugar a resistencia cruzada a drogas no relacionadas estructuralmente, por lo que P-gp tiene sitios de unión para un diverso grupo de drogas, probablemente en su dominio hidrofóbico.

La segunda versión, expone que una proteína de unión a la droga es transportada fuera de la célula por P-gp. La unión es irreversible, y el complejo droga-proteína es expulsado de la célula. La proteína de unión sería un componente celular expresado en cantidades suficientes por ésta.

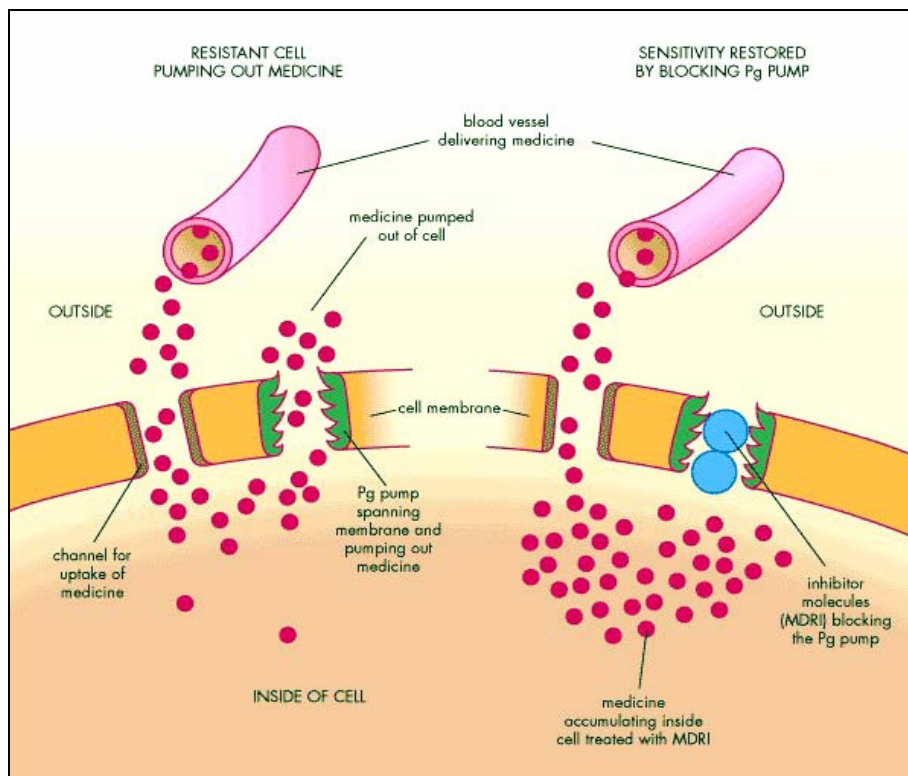
De cualquier modo, P-gp expulsa del medio intracelular compuestos neutros o débilmente básicos, y está implicada en el transporte de productos naturales (Gross y cols., 1986; Ueda y cols., 1987) incluidos agentes antitumorales como antraciclinas, taxanos, derivados de la vinca y epipodofilotoxinas. Ejerce, por tanto, un papel protector de las células frente a compuestos xenobióticos (Figura 8).

La PgP es producto de la expresión del gen MDR1, situado en el cromosoma 7q21 (Gottesman y Pastan, 1993).

La PgP conserva un tamaño y reactividad inmunológica que se conserva entre especies y en todas ellas se relaciona con resistencia múltiple a drogas.

La sobreexpresión del gen MDR1 es el principal mecanismo implicado en la resistencia a drogas. El grado de resistencia generalmente, no siempre, se correlaciona con los niveles de PgP.

Su amplificación está en relación con estímulos del microambiente celular (Sulhai y Miller, 2000) y parece estar modulada por procesos de metilación y desmetilación de sitios CpG de la región del promotor MDR. Se ha planteado la existencia de una relación inversa entre la sobreexpresión del gen MDR1 y el grado de metilación de sitios CpG. Tada y cols. en un estudio sobre cáncer de vejiga y quimioterapia observan que durante el tratamiento el grado de metilación cambia desde un nivel de hipermetilación a un nivel de hipometilación, lo que se acompaña de un incremento de la expresión del gen MDR1. Concluyen que la hipometilación del promotor MDR es una condición necesaria para el aumento de los niveles de mRNA MDR1 y el desarrollo del fenotipo MDR.



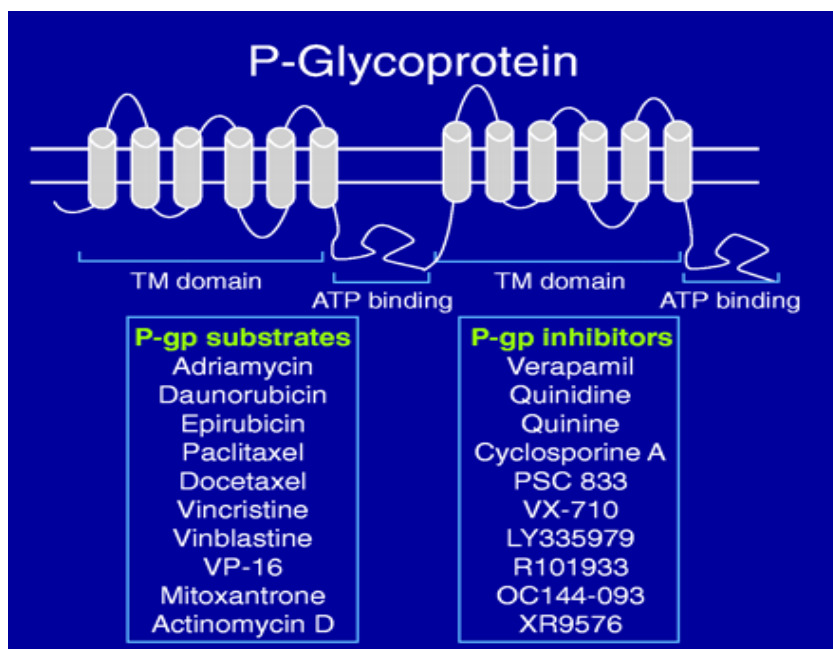
**Figura 8.** Mecanismo de acción de PgP.

Parece que la protein quinasa C juega un papel importante en la modulación de la función de PgP, y que diferencias de fosforilación alteran el fenotipo mdr (O'Brian y cols. 1994).

Diversos tumores expresan PgP y en algunos casos se ha relacionado con menor respuesta clínica a la quimioterapia y peor pronóstico; por ejemplo: sarcomas infantiles, neuroblastoma, leucemia aguda, osteosarcoma, cáncer de mama (Cortés y cols., 1999).

Su mecanismo de acción explica que PgP confiera resistencia a antraciclinas, taxanos, derivados de la vinca y epipodofilotoxinas. Sin embargo, no induce resistencia a otros agentes citostáticos como platinos, antimetabolitos (metotrexate, citarabina, 5-fluoracilo), alquilantes (ciclofosfamida) y bleomicina.

Los inhibidores de los ABC transporters, y fundamentalmente de PgP, han sido ampliamente estudiados como mecanismo de revertir la resistencia a la quimioterapia (Figura 9).

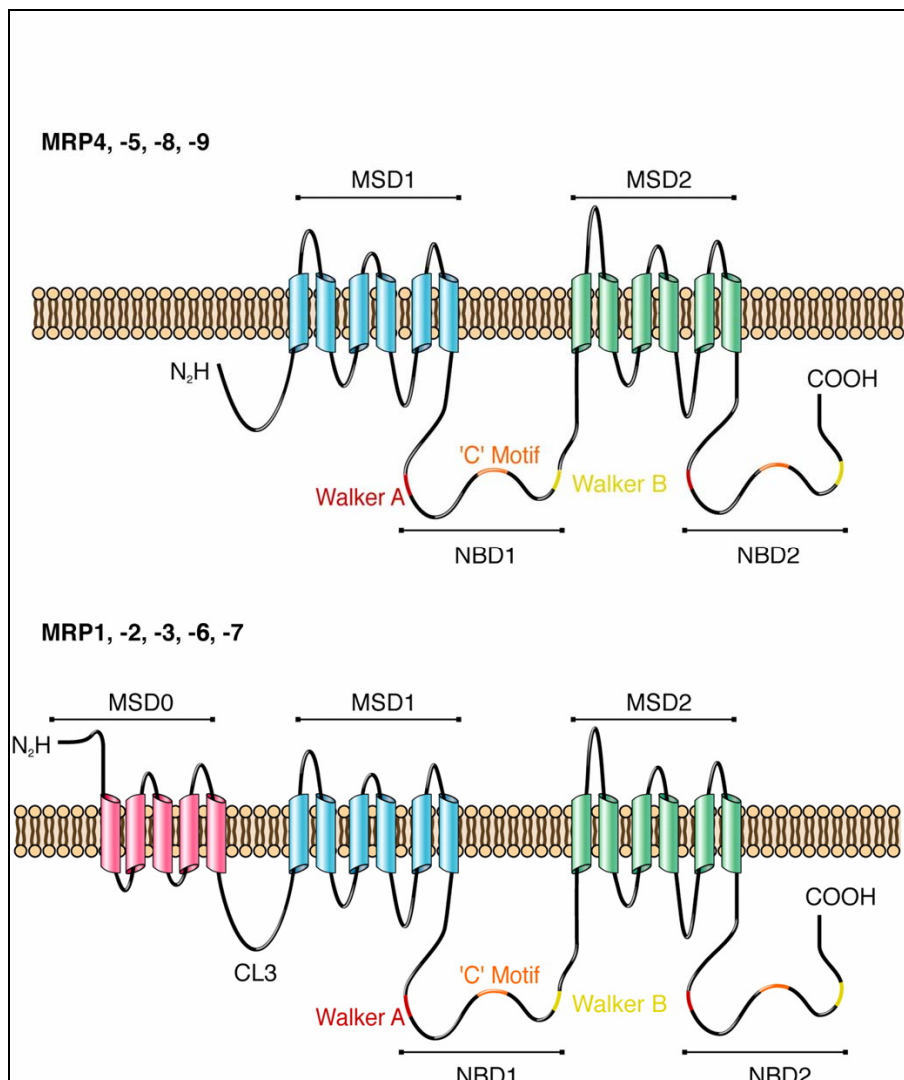


**Figura 9.** Sustratos e inhibidores de PgP. Adaptado de Leonard, Fojo y Bates, 2003.



### 11.1.3. ABCC o Multidrug Resistance–Associated Protein o MRP.

ABCC o MRP es una familia de proteínas. Se han descrito hasta diez miembros diferentes: MRP1 – MRP10 (Figura 10). Se localizan en la membrana plasmática de las células, como PgP, y forman parte de los ABC transporters; también se sitúan en el retículo endoplasmático, lo que sugiere que podrían participar en el secuestro intracelular de sustancias en vesículas citoplasmáticas (Borst y cols., 1992; Kool y cols., 1997; Young y cols., 1999).



**Figura 10.** Estructura de los transportadores MRP.

Las MRP transportan aniones orgánicos y fármacos neutros, conjugados o no con compuestos como el glutatión, los glucuronatos y los sulfatos. Algunos sistemas de expulsión de conjugados de glutatión (GS-X-pumps) podrían ser miembros de la familia MRP. De hecho, los GS-X-pumps que expulsan methotrexate se han relacionado con MRP1, MRP2 y MRP3. Por este mismo mecanismo, estarían implicadas en el transporte de toxinas naturales, sales de metales pesados y con la resistencia a pequeñas moléculas, como el cisplatino.

Miembros	Otros nombres
<b>MRP1</b>	ABCC1 y MRP
<b>MRP2</b>	ABCC2, cMOAT, y cMRP
<b>MRP3</b>	ABCC3, MOAT-D, y cMOAT-2
<b>MRP4</b>	ABCC4 y MOAT-B
<b>MRP5</b>	ABCC5, MOAT-C, y pABC11
<b>MRP6</b>	ABCC6, MOAT-E, MLP-1, y ARA
<b>MRP7</b>	ABCC10

**Tabla 20.** Familia MRP. (Adaptado de Borst y cols., 2000)

· ABCC1 o MRP1.

Descubierta por Cole y cols. en 1992, en una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente que no expresaba PgP. Es la primera de esta familia en ser descrita, y la más estudiada. Se trata de una proteína de 190 kDa formada por 1531 aminoácidos, el 15% homólogo con PgP. Esta codificada por el gen MRP1, situado en el cromosoma 16 p13.

Consta de tres dominios transmembrana y dos dominios intracelulares de unión al ATP (Hipfner y cols., 1997).

Se expresa en la mayoría de los tejidos normales, principalmente en el epitelio digestivo y respiratorio, glándulas endocrinas y sistema hematopoyético (Flens y cols., 1996). Por tanto, se distribuye de manera similar a PgP, si bien MRP1

se expresa más en pulmón, y menos en riñón e hígado. Además también se encuentra en tiroides y próstata.

Mientras que PgP se sitúa en la membrana apical del epitelio, Mrp1 lo hace en la membrana basolateral.

Transporta preferentemente aniones orgánicos, incluidos leucotrieno C4 y conjugados de glutatión o glucurónido. Su función fisiológica más importante es la de ser el principal transportador de leucotrieno C4 (Leier y cols., 1994).

Puede actuar como una bomba de glutatión - sustrato (GS-X-pumps) y conducir drogas conjugadas con GS al exterior de la célula. Así, la sobreexpresión de MRP1 se acompaña de un incremento del transporte ATP dependiente de conjugados de GS; y, una disminución de GS en las células es capaz de revertir la resistencia que produce MRP1. Mediante este mecanismo es capaz de expulsar del medio intracelular antraciclinas, alcaloides de la vinca y metotrexate.

Asimismo se ha identificado MRP1 en vesículas citoplasmáticas (Rajagopal y Simon, 2003) y podría estar implicada en el transporte intracelular. PgP y MRP1 confieren un fenotipo MDR similar que engloba, como se ha dicho, a agentes citotóxicos derivados naturales: antraciclinas, epipodofilotoxinas, derivados de la vinca, y taxanos, si bien MRP1 produce menor resistencia a estos últimos que PgP (Cole y cols., 1994; Deely y cols., 2006). Algunos autores implican a MRP1 en la resistencia a cisplatino. MRP1 se expresa en diversos tumores y su sobreexpresión se ha relacionado con mal pronóstico en leucemia mieloide aguda, retinoblastoma y cáncer de mama (Cortés y cols. 1999).

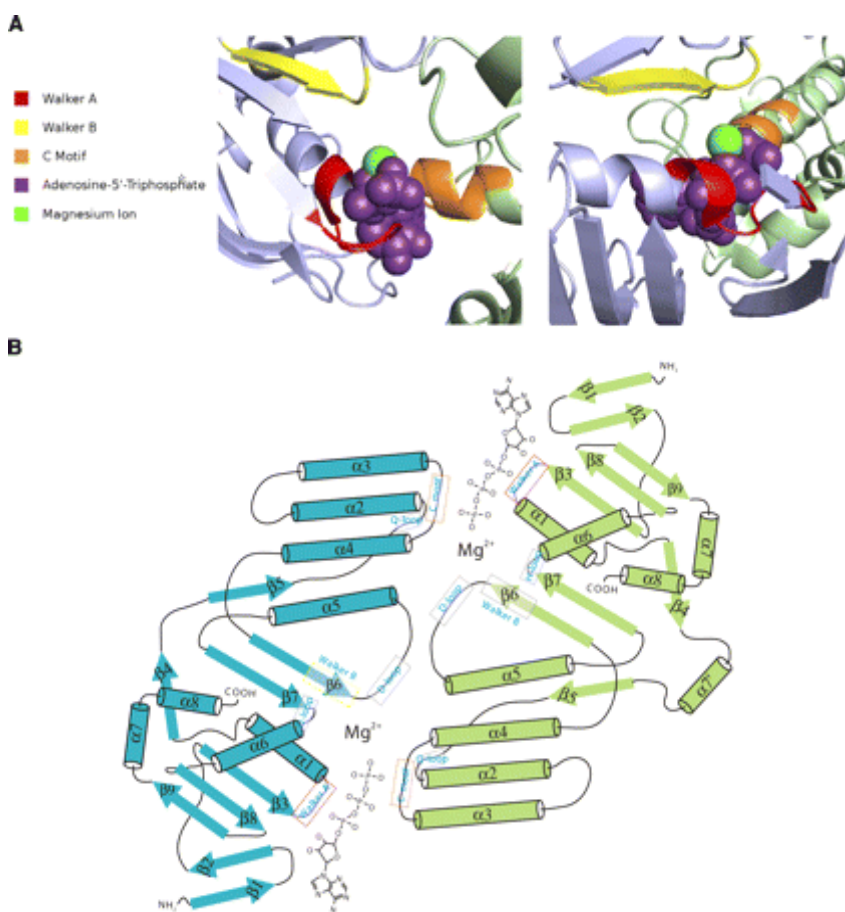
#### · ABCC2 o MRP2.

También llamada canalicular multiespecific organic anion transporter (cMOAT), y cMRP (Buchler y cols., 1996). Es una proteína de 1545 aminoácidos, el 49% de ellos idéntico a MRP1.

El gen MRP2 se localiza en el cromosoma 10 q24.

Esta proteína se expresa principalmente en la membrana de los canalículos de los hepatocitos, aunque también se distribuye en riñón, nervios periféricos, ileon y duodeno (Keppler y cols., 1996).

Transporta aniones orgánicos. Su papel fisiológico más importante es el de transportador de bilirrubina conjugada con glucurónido y de otros aniones orgánicos del hepatocito a la bilis.



**Figura 11.** Estructura MRP1.

MRP2 está ausente en la membrana de los canalículos de los hepatocitos de pacientes con el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck y cols., 1996).

El espectro de resistencia a drogas que induce es similar al de MRP1, si bien, parece establecido que MRP2 induce resistencia a cisplatino, al eliminarlo de la célula conjugado con glutatión.

Al igual que para MRP1, requiere de la presencia de glutatión para actuar, ya sea mediante la conjugación, como en el caso del cisplatino, o bien de forma no conjugada, como con antraciclinas y alcaloides de la vinca (Borst y cols., 2000).

MRP2 se expresa en líneas celulares tumorales de pulmón, hígado, estómago y colorrectales.

#### · ABCC3 o MRP3.

Otros nombres utilizados son MOAT-D y cMOAT-2 (Hirohashi y cols, 1999; Kool y cols., 1999). Su estructura consta de 1527 aminoácidos, un 56% idéntico a MRP1 y un 46% igual a MRP2. Es muy similar por tanto a MRP1 y MRP2, y al igual que ellas, tiene tres dominios transmembrana y dos intracelulares.

Está codificada por el gen MRP3, que se sitúa en el cromosoma 17. Esta proteína se distribuye en hígado, glándula adrenal, páncreas, riñón y bazo (Belinsky y cols 1998; Kool y cols, 1997).

Es un transportador de aniones orgánicos con preferencia por los conjugados con glucurónido, aunque su función fisiológica no es bien conocida. Al igual que MRP2 se sitúa en la membrana basolateral de los hepatocitos y disminuye la concentración intracelular de ácidos biliares (Hirohashi y cols, 1999; Kool y cols., 1999).

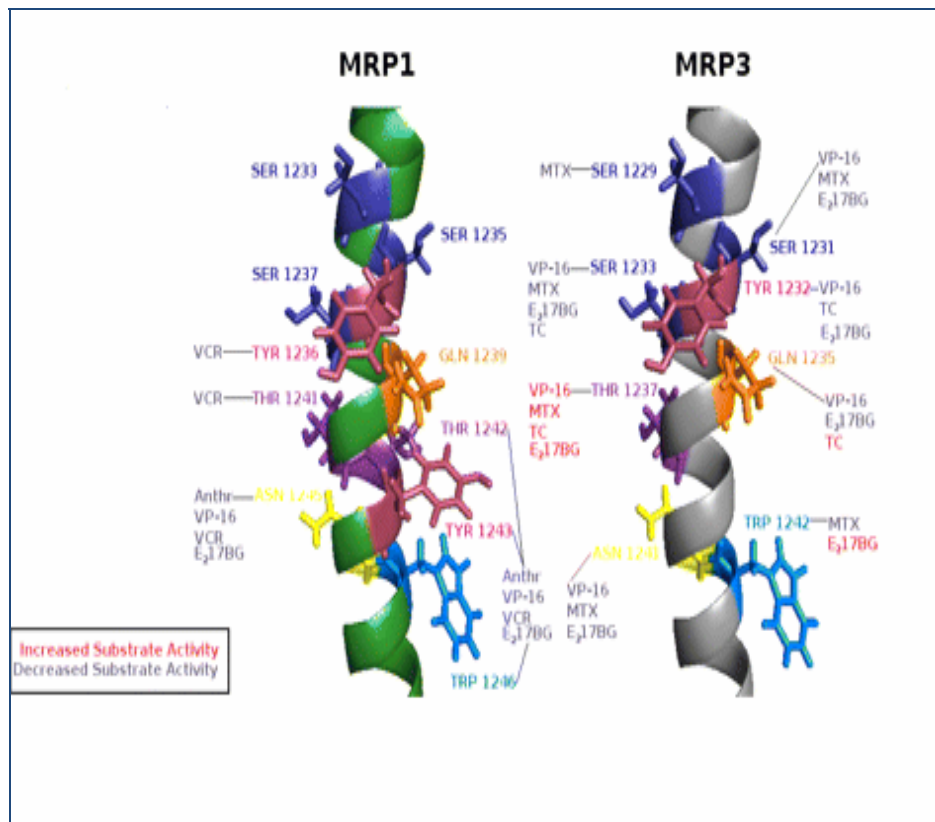
Al igual que MRP1, parece conferir una fuerte resistencia a la doxorubicina, en líneas de cáncer de pulmón, y en menor medida también se relaciona con resistencia a la vincristina, etopósido y methotrexate.

· ABCC4 o MRP4.

También conocida como MOAT-B (Schuetz y cols., 1999). Está formada por 1324 aminoácidos.

El gen MPR4 se encuentra en el cromosoma 13.

Esta proteína se localiza en próstata, pulmón, músculo, testículos, ovario, vejiga y vesícula biliar (Lee y cols., 1998). Su función fisiológica se desconoce. Constituye una bomba de flujo celular de drogas anti VIH, expulsándolas al exterior de la célula. Por esta resistencia a los análogos de los nucleótidos, se cree que puede desempeñar un papel en la resistencia a antineoplásicos, como la 6-mercaptopurina y la tioguanina (Lai y cols., 2002). No existen pruebas que confirmen la participación de MRP4 en la resistencia a quimioterapia de los tumores.



**Figura 12.** Estructura de MRP1, MRP3. (Adaptado de Deely y cols., 2006).

#### · ABCC5 o MRP5.

Denominada también MOAT-C y pABC11 (Wijnholds y cols., 2000). Consta de 1437 aminoácidos.

El gen MPR5 se sitúa en el cromosoma 3 y se expresa prácticamente en todos los tejidos del organismo (Dazert y cols., 2003).

Esta proteína transporta aniones orgánicos conjugados con glutatión.

Su sobreexpresión se ha relacionado con resistencia a tiopurinas, como la 6-mercaptopurina y tioguanina (McAleer y cols., 1999). Sin embargo parece que no induce resistencia a otros citostáticos como antraciclinas, derivados de la vinca, metotrexate o epipodofilotoxinas.

#### · ABCC6 o MRP6

También conocida por MOAT-E y MLP-1

Está constituida por 1401 aminoácidos, el 45% idéntico a MRP1.

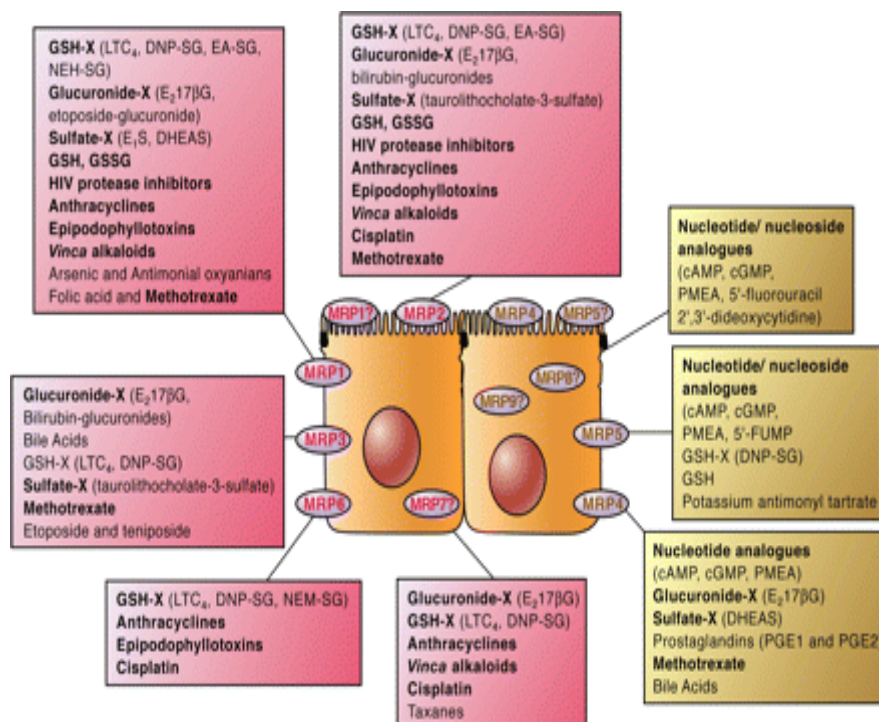
El gen MPR6 se halla en el cromosoma 6 p16, próximo a MRP1.

Esta proteína se distribuye fundamentalmente en hígado y riñón (Kool y cols., 1999).

La sobreexpresión y amplificación del gen MRP6 solo se encuentra en células con sobreexpresión y amplificación del gen MRP1, quizás por su localización próxima en el cromosoma 16.

#### · ABCC10-12 o MRP7-9; ABCC13 o MRP 10

Su función es muy poco conocida (Deely y cols., 2006)



**Figura 13.** Localización y sustratos de la familia MRP. (Adaptado de Deeley y cols., 2006).

#### 11.1.4. ABCG2 o Breast Cancer Resistance Protein o BCRP.

También se denomina MXP (mitoxantrone resistance protein), ABCP (placenta-specific ABC transporter) o ABCG2. Es la mdr proteína de descubrimiento más reciente lo que explica que existan numerosas dudas sobre su función.

Aislada por primera vez en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a mitoxantrone en ausencia de expresión de PgP y MRP1, en 1998 por Doyle y cols. Hasta el momento se han descrito otros tres miembros de ABCG, llamados ABCG1, ABCG5 y ABCG8, implicados principalmente en el transporte de lípidos. (Mao y Unadkat. 2005)

BCRP está codificada por el gen BCRP, localizado en el cromosoma 4 q 22.

Es una proteína de 72kDa, formada por 665 aminoácidos.

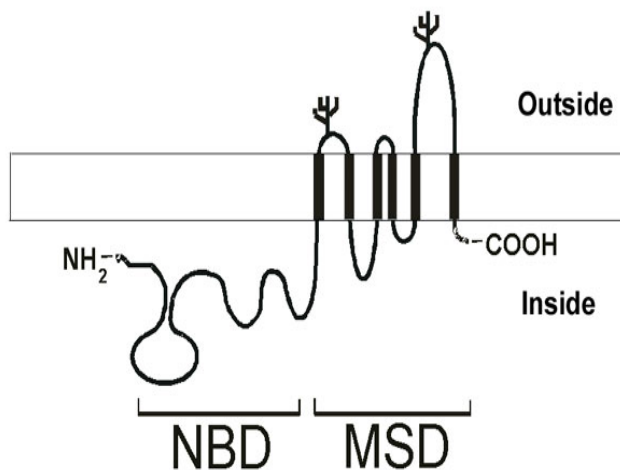
Pertenece, al igual de PgP y MRP, a la familia ABC transporters constituyendo el ABCG2. Está compuesta por 1 dominio transmembrana (TM o



MSD) y 1 dominio intracelular (NBF o NSB), por lo que se denomina half - transporter ABC. Necesita estar en forma de dímero o multidímero para trasladar sustratos de forma eficiente a través de la membrana (Mao y Unadkat. 2005). La subfamilia G es el único half transporter humano, lo que podría implicar un mecanismo de acción algo diferente al resto de ABC transporters (Figura 14).

BCRP se sitúa en la membrana plasmática de las células, al igual que PgP y MRP. Recientemente en un estudio realizado por Rajagopal y Simon se ha encontrado expresión de BCRP en vesículas citoplásmicas.

BCRP se localiza fundamentalmente en órganos relacionados con la absorción, como intestino delgado; distribución, como placenta y BHE; eliminación, como hígado e intestino delgado; además de próstata, colon y ovario.

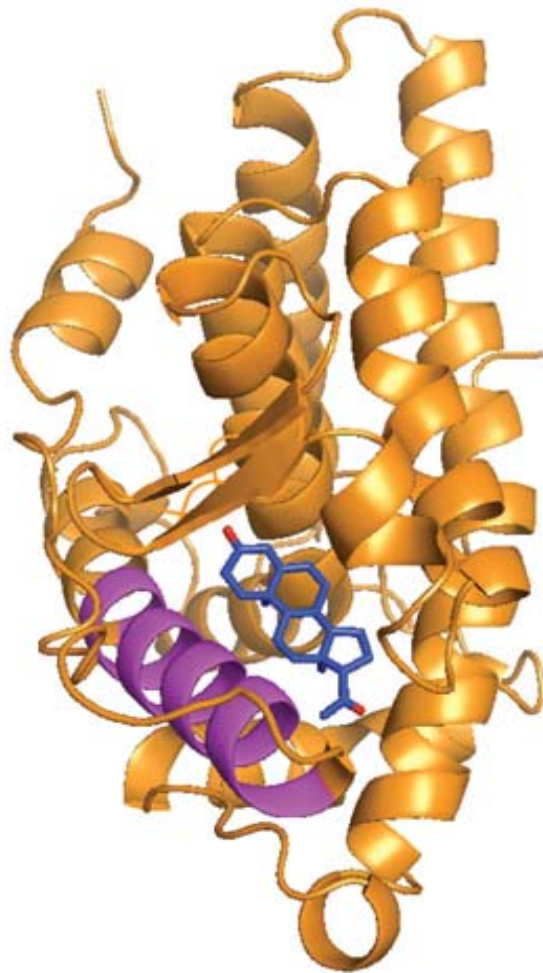


**Figura 14.** Estructura de ABCG2 / BCRP. (Adaptado de Mao y cols., 2005).

Maliepaard y cols. (2001) estudiaron mediante anticuerpos monoclonales frente a BCRP (BXP-34 y BXP-21) la distribución de la misma en el organismo. Concluyen que se encuentra en el sincitiotrofoblasto de la placenta, en la membrana de los canalículos del hígado, en ductos y lóbulos de la mama, en el epitelio del intestino delgado y colon y, en el endotelio de venas y capilares. Estas localizaciones puede que se asocien a posibles funciones fisiológicas de BCRP. En el sincitiotrofoblasto de la placenta podría ejercer una función de protección del feto. Su situación en la membrana de los canalículos biliares del

hepatocito y en las vellosidades de las células epiteliales de intestino delgado y colon sugiere una función excretora de sus sustratos.

Por tanto, BCRP podría desempeñar dos funciones: primero, como ABC transporter es capaz de inducir resistencia a drogas en tumores tratados con agentes antineoplásicos que son sustratos BCRP, expulsándolas del medio intracelular ; segundo, influir en la farmacocinética de estos fármacos afectando su absorción oral y su aclaramiento plasmático, a través de la eliminación intestinal y hepatobiliar.



**Figura 15.** Estructura tridimensional BCRP.

BCRP, al igual que PgP, es capaz de unirse directamente con su sustrato y transportarlo al exterior de la célula.

Los estudios realizados en tejido tumoral y líneas celulares relacionan la sobreexpresión de BCRP con resistencia a mitoxantrone e inhibidores de la topoisomerasa I (CPT 11, topotecán y SN 38), fundamentalmente, en ausencia de expresión de glicoproteína P y familia MRP (Doyle y cols., 2001; Yang y cols., 2000). Otros posibles sustratos son flavopiridol, antraciclinas y metotrexate (Robey y cols., 2001).

Además son sustratos de BCRP fármacos no quimioterápicos, como el pantoprazol.

Su papel como transportador mediante vesículas citoplasmáticas es menos conocido

BCRP se sobreexpresa en células tumorales de neoplasias malignas hematológicas, como leucemia aguda linfoblástica y leucemia mieloide aguda. También estudios en tumores sólidos encuentran sobreexpresión de BCRP en carcinomas de colon, estómago, pulmón y ovario (+ o -). Sin embargo, aunque se clonó por primera vez en líneas celulares de cáncer de mama, no existe evidencia de que juegue un papel importante en la resistencia a quimioterapia de este tumor.

Está en estudio la expresión de BCRP en células stem y su posible aplicación terapéutica (Sarkadi y cols., 2004).

#### **11.1.5. Lung Resistance- Related Protein o LRP.**

Se trata de una proteína de 100kDa, descrita por primera vez en 1993 por Sheper y cols. en líneas celulares de cáncer de pulmón que no expresaban PgP.

El gen LRP se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16, próximo a MRP1 y MRP6.

Forma parte de los “vault complex”, siendo considerada como la major vault protein (Figura 16). Estos complejos de 13MDa constituyen la partícula ribonucleoproteica intracelular más grande (Kerdersha y Rome, 1986).

Fueron observados por vez primera en preparaciones de hígado de rata. Su estructura con múltiples arcos se asemeja a las bóvedas de las catedrales. De ahí que fueran denominadas con el término de “vault” (vault = bóveda).

En la escala filogenética, vault complex se presenta con prácticamente idéntica morfología y tamaño en mamíferos, anfibios, equinodermos, moluscos y protozoos (Kerdersha y cols., 1990; Rome y cols., 1991).

En mamíferos, vault complex, consta de la major vault protein (MVP/LRP) de 100kDa; dos clases de minor vault protein: vault poly ADP-ribose polymerase (VPARP) de 193 kDa y, telomerase-associated protein 1 (TEP-1) de 240 kDa; y, pequeñas moléculas de ARN de entre 88 y 141 bases (Van Zon y cols.; Stephen y cols., 2001).



**Figura 16.** Vault complex.

Cada partícula vault está compuesta por noventa y seis moléculas de MVP, ocho moléculas de VPARP, dos moléculas de TEP1 y al menos seis moléculas de ARN.

La MVP representa el 70% de la masa de todo el complejo y se dispone en la parte central del mismo.

Los vault complex se localizan principalmente en el citoplasma, probablemente en asociación a vesículas citoplasmáticas, y, en menor grado, en la membrana nuclear, formando parte de los complejos porosos o NPC (nuclear pore complex). Aunque su función fisiológica no está totalmente definida, se piensa que estas partículas están implicadas en el transporte intracelular como unidades transportadoras de los NPC, y en el transporte bidireccional núcleo-citoplasma a través de vesículas. Se comportaría como un agente detoxificador de la célula. (Dalton, Scheper, 1999; Kitazono y cols., 1999; Dingemans y cols., 1996)

De forma fisiológica se expresa en colon, pulmón, túbulo renal proximal, corteza adrenal y macrófagos.

La expresión de LRP en líneas celulares tumorales se ha asociado con resistencia a doxorubicina, vincristina, cisplatino, carboplatino y melfalán (Dingemans y cols., 1996).

Un estudio de Kitazono y cols. (1999) que trata de dilucidar el papel de LRP en la resistencia a drogas, concluye que LRP induce resistencia a doxorubicina, vincristina, etopósido y paclitaxel. También implica a LRP en el transporte de doxorubicina desde el núcleo al citoplasma, lo cual significa una disminución de la concentración intranuclear del citostático sin que varíe la concentración intracelular del mismo.

Determinar su papel en la resistencia múltiple a drogas resulta difícil por dos razones fundamentalmente. La primera de ellas es que la transfección de células con DNA de la MVP/LRP no se ha traducido en la adquisición a resistencia a drogas. Quizás porque MVP es un componente de toda una estructura multiproteica, y sea todo el complejo vaults el que induce resistencia a drogas, y no LRP sola. La segunda razón es que LRP se expresa de forma concomitante con otros genes implicados en el fenotipo MDR, especialmente MRP y BCRP, lo que dificulta la determinación del verdadero rol de LRP (Kitazono y cols., 1999).

Ensayos clínicos informan que la expresión de LRP en células tumorales constituye un factor predictor de resistencia a drogas y pobres resultados

terapéuticos en pacientes con leucemia mieloide aguda, cáncer de ovario y otras neoplasias malignas.

## **11.2. ESTUDIOS SOBRE EL FENOTIPO MDR EN TUMORES SOLIDOS Y NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.**

La adquisición del fenotipo MDR por las células tumorales durante el tratamiento o incluso previo a él, como una característica inherente al tejido tumoral, ha sido objeto de numerosas investigaciones. En ellas se trata de relacionar la sobreexpresión de las proteínas expuestas anteriormente (PgP, MRP, BCRP y LRP) en las células tumorales, con la resistencia de las mismas al tratamiento quimioterápico.

Alcanzar una conclusión de estos estudios constituye una difícil tarea debido a la variabilidad de los resultados publicados. Esto, en parte, es consecuencia de las diferencias en la metodología utilizada en estos estudios, lo que plantea la necesidad de un consenso internacional (Beck y cols., 1996)

El análisis de las proteínas implicadas en la resistencia a drogas es más fiable en las neoplasias hematológicas que en tumores sólidos, en los que existe una mayor influencia de factores farmacodinámicos y farmacocinéticos.

Los estudios en tumores sólidos utilizan como material principal líneas celulares experimentales o muestras tumorales obtenidas de los pacientes.

El **gen MDR1 y su proteína PgP** son los factores más estudiados. Estudios en neoplasias hematológicas (Dalton y cols., 1989a; Salmon y cols., 1989; Dalton y cols., 1989b; Chan y cols., 1990; Epstein y cols., 1989; Niehans y cols., 1992) correlacionan los niveles altos de expresión MDR1 en linfomas no Hodgkin y mielomas con mala respuesta a la quimioterapia e intervalos libres de enfermedad más cortos. Un factor a tener en cuenta es que el número de pacientes incluido en estos estudios era relativamente bajo.

Diversos estudios (Holmes y cols., 1989; Sato y cols., 1990; Pirker y cols., 1991; Campos y cols., 1992; Marie y cols., 1991) asocian la expresión de MDR1 en leucemia mieloide aguda como factor pronóstico negativo por disminución del

número conseguido de remisiones de la enfermedad y recaídas de la enfermedad en intervalos de tiempo más cortos.

Halzmayer y cols. (1992) realizaron un estudio retrospectivo para medir mRNA MDR1 en 100 muestras de biopsia de tumores sólidos, que incluían 60 de carcinoma de ovario y 32 de pulmón. Para ello utilizaron técnicas basadas en PCR. Los niveles de MDR1mARN se asociaron a resistencia a esquemas de quimioterapia combinada, en cáncer de ovario y carcinoma de pulmón células pequeñas. La presencia de MDR-1 en células tumorales podría considerarse como un factor predictivo de resistencia a la quimioterapia en ambas enfermedades neoplásicas.

Robert J. Arceci (1993) en un editorial hace una revisión sobre el significado clínico de la PgP en el fenotipo MDR.

Expone que la resistencia a agentes antitumorales puede estar presente desde el inicio de la enfermedad o bien desarrollarse en el transcurso del tratamiento citostático.

Hace hincapié en el hecho de que no haya un consenso en la metodología utilizada en las investigaciones sobre el gen MDR1, lo que dificulta el análisis de los distintos estudios.

Resume los resultados de diferentes estudios (Roninson y cols., 1992; Pastan y cols., 1991; Fojo y cols., 1987; Goldstein y cols., 1989; Noonan y cols., 1990), que utilizando diversos métodos de detección, han examinado la expresión de ARNm MDR1 en diferentes tumores sólidos y neoplasias hematológicas. Los resultados hablan de niveles altos en tumores sólidos que proceden de tejidos que de forma fisiológica expresan PgP, como carcinoma de colon, riñón, páncreas y glándula adrenal. Niveles intermedios en neuroblastoma, sarcomas de partes blandas, tumores neuroendocrinos derivados de pulmón, tumores carcinoides, linfomas, leucemia mieloide crónica en crisis blástica y leucemias agudas. Niveles relativamente bajos en carcinoma de pulmón de células pequeñas; carcinoma de pulmón no células pequeñas; carcinomas de esófago, estómago, cabeza y cuello, ovario, mama; tumor de Wilm; hepatoblastoma; gliomas; y mielomas.

Además, en un grupo que incluye leucemias agudas, linfomas, mielomas y posiblemente carcinoma de mama, se observó que inicialmente los niveles de

ARNm MDR1 eran bajos, y tras el tratamiento quimioterápico, se incrementaron. Esto podría deberse a la expresión de MDR1 en la enfermedad tumoral residual, que sobrevive a través de la resistencia que ofrece mediante PgP (Fojo y cols.1987; Goldstein y cols., 1989; Holmes y cols., 1989; Dalton y cols., 1989a; Salmon y cols.,1989; Dalton y cols.,1989b)

Estas conclusiones plantean la futura consideración de la expresión del gen MDR1 como un factor de mal pronóstico independiente.

Perri y cols. (2001) han estudiado el papel de PgP en sarcomas de Ewing y tumores neuroectodérmicos periféricos. Se encontró expresión de PgP en el 64% de los casos, pero no se relacionó con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Van der Zee y cols. (1995) evaluaron el valor pronóstico de PgP, glutatión-s-transferasa, p53 y c-erb-2 en pacientes con cáncer de ovario metastásico, 89 muestras de tumor antes del tratamiento y 38 muestras de tumor residual. El esquema de quimioterapia incluía platino y doxorubicina. La expresión de PgP era mayor en las muestras de tumor residual tras tratamiento de forma significativa. Sin embargo la conclusión es que ninguno de estos parámetros permite predecir la respuesta a quimioterapia.

Mechetner y cols. (1998) han determinado la expresión de PgP en una línea celular de cáncer de mama (MCF7) y en muestras de tumor de pacientes. El tratamiento empleado incluía doxorubicina y paclitaxel. Se encontró un aumento de la expresión tras recibir tratamiento (de 11 a 30%) y esto se correlacionaba con resistencia a los fármacos. La expresión in vitro también se relacionó con resistencia a doxorubicina y paclitaxel. Por tanto, concluyen que PgP contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida del cáncer de mama, y que puede influir en la respuesta al tratamiento.

Se ha realizado un metaanálisis que incluye 31 estudios sobre PgP y cáncer de mama, que concluye que PgP se expresa en las células de cáncer de mama, que su expresión aumenta tras la quimioterapia y que se asocia con fallo a tratamiento (Trock y cols., 1997).

Estudios en vejiga de expresión de PgP no arrojan resultados definitivos del papel de PgP en este tumor (Park y cols., 1994; Nakagawa y cols., 1997).



Chan y cols. (1990) determinan una fuerte relación entre el incremento de los niveles MDR1 y la recaída en niños con sarcoma de partes blandas. Este estudio resalta la importancia de encontrar pequeñas áreas dispersas que expresan PgP en la muestra tumoral. Este tipo de expresión parcheada también se ha encontrado en los límites de muestras de carcinoma de colon invasivo.

Prados y cols. (1999) analizaron los niveles de expresión MDR1/PgP en la línea celular RMS-GR, procedente de rhabdomyosarcoma embrionario tratado in vivo con poliquimioterapia. Estas células presentan resistencia a vincristina, doxorubicina y actomicina D, fármacos que forman parte del tratamiento estándar de esta enfermedad neoplásica. Concluyen que el tratamiento quimioterápico induce resistencia mediada por la PgP en las células RMS-GR.

En relación a la **familia MRP**, desde el descubrimiento de MRP1 se han desarrollado numerosos estudios sobre ésta.

Para establecer el papel de MRP en la resistencia múltiple a drogas, Grant y cols. (1994) llevaron a cabo un estudio que consistía en la transfección de células Hela con vectores que expresaban MRP. Las células transfectadas presentaron resistencia a doxorubicina, vincristina y VP-16, proporcional al incremento de los niveles de Mr 190,000, una proteína de membrana reconocida por anticuerpos antiMRP. No ocurría lo mismo con cisplatino.

Kool y cols. (1997) han investigado el posible rol de MRP2, MRP3, MRP4 y MRP5 en la resistencia a drogas. Para ello examinaron la expresión de estas proteínas en distintas líneas celulares, todas ellas descritas anteriormente en la literatura. Encontraron niveles elevados de MRP2 en diversas líneas celulares que presentaban resistencia a cisplatino y en algunas líneas de cáncer de pulmón no células pequeñas (SW1573/ S1) que presentaban resistencia a doxorubicina. Mientras que los niveles de expresión MRP2 se correlacionaban con la resistencia a cisplatino, no ocurría lo mismo con la resistencia a doxorubicina.

MRP3 y MRP5 se sobreexpresaron en distintas líneas celulares que presentaban resistencia, sin existir una clara correlación entre dicha resistencia y los niveles de expresión de ambas proteínas. MRP4 no se sobreexpresaba en ninguna línea celular investigada.

Distintos estudios han evaluado la expresión de **BCRP** en leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda con resultados dispares. La discrepancia observada puede deberse a diferencias metodológicas en la medición de los niveles de BCRP (inmunohistoquímica con diferentes anticuerpo, técnicas de PCR,...), así como a la variabilidad de los pacientes examinados.

Scheffer y cols. han analizado la expresión de BCRP en tumores sólidos, 34 muestras tumorales de pacientes no tratados y 7 muestras de pacientes tratados, mediante técnicas de inmunohistoquímica. Solo han encontrado expresión en una muestra de adenocarcinoma de intestino delgado.

Diestra y cols. analizan la expresión de BCRP en 150 muestras de tumores sólidos, mediante inmunohistoquímica. En el 60% de los casos hay expresión moderada o fuerte. Se expresa principalmente en carcinoma gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de endometrio, cáncer de colon, cáncer de pulmón microcítico y melanoma.

Candeil y cols. estudian la expresión de BCRP en las muestras tumorales de 42 pacientes con cáncer de colon. Concluyen que BCRP podría estar implicada en la resistencia a irinotecan.

En relación a **LRP**, no existe una evidencia clara de que la expresión de esta proteína *mdr* se relaciona con peor respuesta y mal pronóstico.

Se han realizado estudios principalmente en neoplasias hematológicas como mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda, con resultados dispares que impiden llegar a la conclusión de que la expresión de LRP se relaciona con menor respuesta a los tratamientos quimioterápicos.

En tumores sólidos también se han realizado algunos estudios, con similares resultados.

Izquierdo y cols. (1999) estudiaron el papel de LRP en carcinoma de ovario avanzado. Encontraron una expresión del 77%, que se relacionaba con peor respuesta y supervivencias más cortas. Sin embargo, en un estudio realizado en estadios precoces (Arts y cols., 1999) la expresión de LRP se relacionaba con pronóstico favorable.

En cáncer de pulmón no células pequeñas se han realizado estudios que encuentran expresión de LRP, pero ésta no se correlaciona con tasa de

respuestas a la quimioterapia (Dingemans y cols., 1996; Volm y cols., 1997b). Lo mismo ocurre en estudios realizados en cáncer de mama, donde a pesar de encontrar niveles altos de expresión de LRP, no hay relación con parámetros clínicos (Pohl y cols., 1999; Linn y cols., 1997).

También se ha detectado LRP en melanoma, osteosarcoma y neuroblastoma (Ramani y Dewchand, 1995).

Otros estudios han explorado la **co-expresión** de distintas proteínas mdr y su influencia en la respuesta al tratamiento antineoplásico (Burger y cols., 2003).

La investigación del fenotipo MDR está en pleno desarrollo con múltiples estudios en marcha. No está claramente establecido su papel en la resistencia a quimioterapia, sobre todo en el caso de tumores sólidos.

### **11.3. ESTUDIOS SOBRE EL FENOTIPO MDR EN CÁNCER DE PULMÓN DE CELULAS NO PEQUEÑAS.**

Como se ha expuesto anteriormente, la resistencia a múltiples fármacos en ocasiones se presenta desde el momento del diagnóstico, como una característica propia de las células tumorales. Este es el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (Scagliotti y cols., 1999), que constituye una entidad muy heterogénea que, a veces, se muestra quimiorresistente y no responde al tratamiento.

El tratamiento quimioterápico en esta neoplasia está justificado, tanto en la enfermedad local como en la avanzada, a raíz de los resultados que arrojan los estudios realizados.

La quimiorresistencia del CPCNP es un obstáculo en el tratamiento de esta neoplasia y, se debe principalmente a la expresión del fenotipo mdr.

Desafortunadamente hay muy pocos estudios publicados y la expresión de proteínas de resistencia se muestra muy variable dependiendo, entre otros factores, del régimen de quimioterapia utilizado.

Además, no existe una clara evidencia de que la expresión de proteínas mdr en muestras de CPCNP constituya un factor predictivo de respuesta.

Coley, Workman y Twentyman (1999) examinaron una línea celular de carcinoma de pulmón de células grandes (COR-L23/R). Observaron que estas células presentaban resistencia a daunorrubicina, vincristina, colchicina y etopósido. Estas drogas eran expulsadas del medio intracelular a través de una bomba de ATP. Sin embargo estas células no expresaban PgP. Así, plantean la existencia de otras proteínas transportadoras involucradas a la resistencia a fármacos (familia MRP).

En una revisión, Scaglioti y cols.(1999) analizan la resistencia a múltiples drogas en células tumorales de CPCNP. Asumen la implicación de PgP, MRP, LRP y de altered topoisomerasa associated protein.

PgP parece a priori ser un factor poco importante en la adquisición del fenotipo MDR en este tipo de tumor. Esta observación se basa en dos estudios fundamentalmente. En el primero, Goldstein y cols.(1989) detectaron ARNm MDR1 en solo 5 líneas celulares de CPCNP de las 40 estudiadas.

El segundo es el estudio de Oka y cols. (1997) en el que se evaluaron 87 muestras de tejido pulmonar afecto por CPCNP, mediante Northern blotting. Encontraron que solo el 15% era positivo, y en estos casos los niveles eran bajos, excepto en una muestra de adenocarcinoma.

Se recalca que MRP se expresa en el tejido pulmonar sano, por tanto la medida de ésta en células tumorales debe compararse con la expresión basal en células normales.

Ota y cols. (1995) cuantificaron los niveles de expresión de MRP mediante Northern blot en comparación con los niveles de MDR1 determinados por RT-PCR, en 104 muestras de CPCNP. El 32% expresaba MRP en diferentes niveles. Las muestras que presentaban mayor nivel de expresión eran predominantemente carcinomas escamosos, y la mayoría no expresaba MDR1 (MRP++ / MDR1-). 61 pacientes recibieron quimioterapia con agentes sustratos de MRP: vindesina y etopósido. De éstos, el 38% expresó niveles altos o moderados de MRP y, presentó peor pronóstico en relación a los que expresaban niveles bajos o no expresaban MRP.

Sugawara y cols.(1995) evaluaron la expresión de MRP1 en muestras de cáncer de pulmón de pacientes no tratados por inmunohistoquímica y RT-PCR. Por inmunohistoquímica encuentran niveles de expresión altos en

adenocarcinoma, principalmente en los bien diferenciados. Por RT-PCR detectan expresión en adenocarcinomas y también en carcinomas epidermoides. Además por microscopia electrónica localizan MRP1 en la membrana plasmática y también en retículo endoplásmico rugoso.

Nooter y cols. (1996) analizaron la expresión del gen MRP en tejido pulmonar sano y muestras de tumor de 35 pacientes con CPCNP que habían sido operados. Utilizaron técnicas de inmunohistoquímica y detección de ARN (RPA). ARNm MRP se evaluó en 12 muestras de tejido sano y 22 muestras de CPCNP. El 32% de las muestras tumorales presentaba niveles elevados de ARNm MRP, mientras que el tejido sano mostraba niveles bajos. Por inmunohistoquímica el 75% de las muestra de CPCNP expresaba MRP (+ o ++), especialmente carcinomas epidermoides bien diferenciados.

Oshika y cols. (1998) mediante técnicas de inmunohistoquímica estudian la expresión de MRP y p53 mutada en 107 muestras de CPCNP. La coexpresión de ambas mostró tendencia a la significación ( $p = 0.11$ ). 26 pacientes con tumores MRP + se sometieron a quimioterapia con agentes quimioterápicos sustratos de MRP, como etopósido y vindesina. Tuvieron peor respuesta que pacientes MRP- ( $p = 0.17$ ).

Wright y cols. (1998) detectaron por técnicas de inmunohistoquímica la expresión de MRP en cáncer de pulmón y tejido pulmonar normal. Utilizaron las muestras extraídas a 135 pacientes sometidos a cirugía, de los cuales 109 eran CPCNP, y el resto CPCP y mesotelioma. El 12% de los casos no expresó MRP (-); el 15% bajo nivel de expresión (+); el 33% niveles intermedios-altos en menos de 50% de la masa tumoral (++); y, el 40% expresaba niveles intermedios-altos en más del 50% de la masa tumoral. Por tanto el 73% de las muestras expresaban MRP con niveles intermedios-altos. En relación a la histología, los adenocarcinomas mostraron más frecuentemente niveles intermedios-altos.

Young y cols. (1999) midieron la expresión de MRP1-5 en líneas celulares experimentales y en muestras de tejido tumoral de pacientes con CPCNP y CPCP. La mayoría de los enfermos con CPCP había recibido tratamiento quimioterápico con escaso resultado, mientras que la mayoría de los enfermos con CPCNP no había recibido ningún tipo de tratamiento.

Observaron en las muestras de pacientes que los niveles de MRP3 eran mayores en el caso de CPCNP. Esto podría explicar la resistencia intrínseca de este tumor. MRP-1 y MRP-3 mostraron una correlación positiva con la resistencia a doxorubicina, vincristina, etopósido e inesperadamente a cisplatino.

Sin embargo, no encontraron relación entre los niveles de MRP2, MRP4 y MRP5, y la resistencia a alguna droga.

Young y cols. (2001) continuaron este trabajo con el análisis de MRP1 y MRP3 en treinta líneas celulares de cáncer de pulmón que incluían las utilizadas en el primer estudio. Los resultados reforzaron la hipótesis de que MRP1 y MRP3 son componentes del fenotipo MDR y además MRP3 contribuye a la resistencia intrínseca del CPCNP.

Dingemans y cols. evaluaron mediante inmunohistoquímica la expresión de topoisomerasa alfa, topoisomerasa beta, ki67, MRP1 y LRP, en 38 muestras de pacientes con CPCNP. Los pacientes recibieron quimioterapia con cisplatino-paclitaxel, cisplatino-VM26 o VP16, o carboplatino-VP16-ifosfamida. Ninguno de los marcadores se relacionó con la respuesta a la quimioterapia ni con la supervivencia.

Lu y cols. (2001) investigaron la expresión de LRP en muestras de tumor de 69 pacientes con CPCNP. El 57% expresaba LRP. Esta expresión se relacionó con peor respuesta a la quimioterapia recibida ( $p < 0.05$ ).

Harada y cols. (2003) estudiaron el valor predictivo de respuesta a quimioterapia de la expresión de p53, bcl-2 y LRP. Utilizaron las muestras tumorales obtenidas por biopsia transbronquial de 57 pacientes con CPCNP, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento. Los pacientes recibieron quimioterapia con platino. La expresión se detectaba mediante inmunohistoquímica. P53 se expresaba en el 28% de las muestras y se relacionó de forma significativa con la respuesta a QT en aquellos casos de carcinoma no escamoso (adenocarcinoma y carcinoma de células grandes): 38% de respuestas en p53 + y 6% de respuestas en p53 -. Bcl-2 se expresaba en el 71% de las muestras y no se correlacionó con la respuesta al tratamiento. LRP se detectó en el 73% de los casos y se relacionó con peor respuesta a la

quimioterapia en el caso de los carcinomas escamosos: 33% de respuesta en LRP+ vs 100% de respuestas en LRP -,  $p= 0.02$ ).

Kawabata y cols. (2003) han analizado la expresión de BCRP en veintitrés muestras de CPCNP no tratado y en líneas celulares de cáncer de pulmón, mediante la real time reverse transcription PCR. Concluyen que algunas muestras expresan suficientes niveles de BCRP como para conferir resistencia a drogas.

Berger y cols. (2005) estudiaron la expresión de MRP en 15 líneas celulares, mediante RT-PCR y protein immunoblotting. MRP se expresaba en las líneas celulares con distinta intensidad. Se concluye que existe una correlación entre la expresión de MRP y la resistencia a quimioterapia.

Yoh y cols. (2004) han demostrado una fuerte correlación entre la expresión de BCRP y la respuesta a quimioterapia con platino, en muestras de tumor de 72 pacientes con CPCNP estadios IIIB y IV, no tratados previamente. Encuentran que PgP, MRP1, MRP2 y MRP3 no se relacionan con la respuesta al tratamiento ni con la supervivencia. Sin embargo los pacientes BCRP + obtienen peor respuesta y menor supervivencia que los BCRP -.

Filipits y cols. (2007) han analizado la expresión de MRP en los pacientes reclutados en el estudio IALT. Para ello han evaluado los niveles de MRP1 y MRP2 por inmunohistoquímica en las muestras tumorales de los 782 pacientes del estudio. Además analizan estos niveles como posibles factores pronóstico y predictivos de respuesta. La expresión de MRP1 es positiva en el 47% y la de MRP2 en el 40% de los pacientes. Los pacientes con expresión de MRP2 tienen una supervivencia global más corta que los MRP2 negativos, de forma estadísticamente significativa. No existe correlación entre expresión de MRP1 y supervivencia global. Asimismo ni MRP1 ni MRP2 predicen la respuesta a la quimioterapia. Por tanto, exponen que la expresión de MRP2 es un factor pronóstico independiente en pacientes intervenidos radicalmente de CPCNP.

Paredes Lario y cols. (2007) han estudiado la expresión de PgP, MRP1 y LRP en 147 muestras de 143 pacientes con cáncer de pulmón no células pequeñas (101 válidas para estudio), utilizando pruebas de inmunohistoquímica. En 16 casos no hubo expresión de ninguna proteína. En 32 casos se expresó una sola, la más frecuente LRP. En 34 casos se coexpresaron 2 proteínas,

principalmente LRP y PgP. En 17 casos se expresaron las tres. De los pacientes que recibieron quimioterapia, se evaluó la relación de expresión de las proteínas y la respuesta al tratamiento, y se encontró una peor respuesta en caso de expresión. Sin embargo la expresión de estas tres proteínas mdr no se correlaciona con supervivencia.

Podemos concluir a raíz de esta revisión, que en la resistencia a drogas en el CPCNP están implicados múltiples mecanismos, tal vez reflejo de la propia heterogeneidad de este tumor. Entre ellos se encuentran PgP, MRP, LRP, BCRP y alteraciones en la topoisomerasa II.

A pesar de las investigaciones desarrolladas aún queda mucho por saber de la resistencia a drogas en el carcinoma de pulmón no microcítico.

Estudio	muestra	técnica	PgP	MRP1	MRP3	BCRP	LRP	resultados
Ota	Tumor	RT-PCT Northern Blot	-	+/++				Peor pronóstico en MRP+/++
Sugawara	Tumor	IH RT-PCR		+				
Nooter	Tumor	IH RPA		+/++				
Oshika	Tumor	IH		+				Peor respuesta en MRP1+
Wright	tumor	IH		++/++ +				
Young	Líneas celulares Tumor			+/++	+/++			Peor respuesta en MRP1-3 +
Young	Líneas celulares			+/++	+/++			
Dingemans	Tumor			+			+	No relación con respuesta
Lu	Tumor						++	Peor respuesta en LRP++
Harada	Tumor	IH					++	Peor respuesta en LRP++
Kawataba	Tumor Líneas celulares	RT-PCR				+		
Yoh	tumor		+	+	+	+		Peor respuesta en BCRP+



<b>Berger</b>	Líneas celulares	RT-PCR Protein immunoblotting		+		Peor respuesta en MRP+
<b>Filipits</b>	Tumor	IH		+/++		No relación con respuesta ni supervivencia
<b>Paredes Lario</b>	Tumor	IH	++	+	++	Peor respuesta cuando PgP/MRP1/LRP+

**Tabla 21.** Estudios de expresión del fenotipo mdr en CPCNP.

#### 11.4. ESTUDIOS EN SANGRE DEL FENOTIPO MDR.

En los estudios expuestos hasta ahora, el material usado siempre ha sido líneas celulares experimentales o muestras de tejido tumoral del paciente.

En la literatura existen muy pocas investigaciones sobre tumores sólidos que hayan analizado la expresión de los genes implicados en el fenotipo MDR en células de sangre periférica.

En 1992, Geromin y cols. (1992) evaluaron la expresión de PgP en células de sangre periférica de pacientes con cáncer durante el tratamiento con quimioterapia. No encontraron variación en estos.

Oguri y cols. (1998) determinaron la expresión del gen LRP mediante RT-PCR en: ochenta muestras de autopsias, que incluían cuarenta cánceres de pulmón tratados con platino y cuarenta muestras de tejido pulmonar normal; dos líneas celulares de cáncer de pulmón; y, células mononucleares periféricas de ocho pacientes (antes y después de la administración de platino). No encontraron que aumentara la expresión de LRP tras platino en ninguna de las situaciones.

Realizaron otros estudios (Oguri y cols., 2000; Oguri y cols., 2001) cuyo objetivo era determinar la expresión de MRP3, MRP4 y MRP5 mediante RT-PCR en células mononucleares de sangre periférica de 10 pacientes con cáncer de pulmón no tratados previamente. Se realizaba una extracción antes de la administración de carboplatino y otra 24 horas después. Encontraron que

los niveles de MRP3 se incrementaban tras la administración de quimioterapia, mientras que no se observó variación en los niveles de MRP4 ni de MRP5. Estos estudios se completaban con la determinación de los genes en 80 muestras de tejido pulmonar de 40 pacientes con cáncer de pulmón tratados con platino, 40 muestras correspondían a tejido tumoral y 40 a tejido sano. Los resultados son que MRP3, MRP5 aumentan tras exposición a platino, mientras MRP4 no.

### **11.5. INHIBIDORES DEL FENOTIPO MDR.**

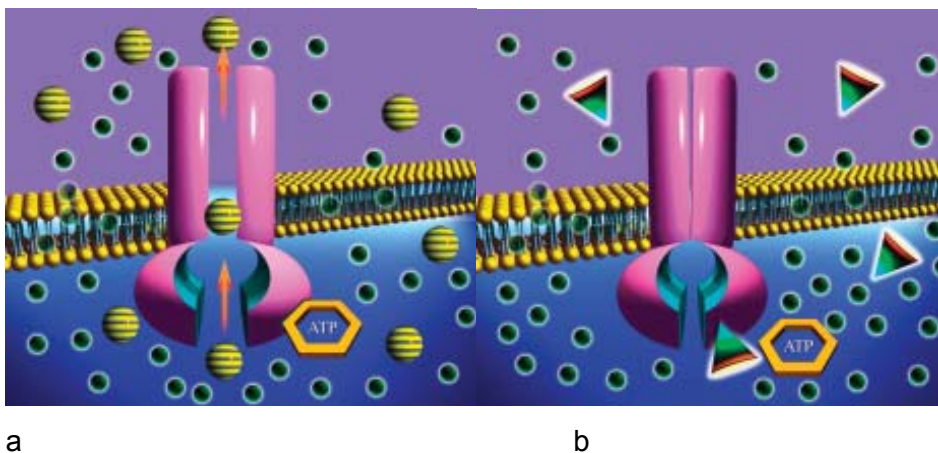
Los inhibidores de los ABC transporters, y fundamentalmente de PgP, han sido ampliamente estudiados como mecanismo de revertir la resistencia a la quimioterapia.

Podemos distinguir tres generaciones de inhibidores de PgP (Thomas y Coley, 2003).

La 1ª generación la constituyen sustratos de PgP que compiten con los agentes quimioterápicos. Encontramos fármacos como ciclosporina A, verapamilo, tamoxifeno, inhibidores de la calmodulina, cefalosporinas... Se han realizado numerosos estudios, fundamentalmente con ciclosporina y verapamilo. Los resultados no han sido satisfactorios por las altas dosis de estas sustancias que había que administrar, lo que se traduce en una toxicidad inaceptable. Además, estos estudios son unicéntricos y con tamaños muestrales insuficientes.

Esto da lugar al desarrollo de moléculas más selectivas y potentes, apareciendo la 2ª generación de inhibidores. Los agentes más destacados son valspodar (derivado de ciclosporina C) y biricodar. Estos fármacos presentan una alta afinidad por la bomba PgP. Su principal limitación es que son inductores del citocromo P450, que media el metabolismo de numerosos citotóxicos. Las interacciones farmacológicas impredecibles hacen muy difícil establecer una dosis segura del esquema quimioterápico. Además esta 2ª generación, produce inhibición de otros ABC transporters con funciones fisiológicas beneficiosas para el organismo (Thomas y Coley, 2003).

Así surge una 3ª generación de moléculas, que inhiben específicamente PgP y no afectan al citocromo P450. Estos fármacos están en pleno desarrollo, con numerosos estudios en marcha, pero hasta el momento solo in vitro. Los más prometedores son tariquidar (que también inhibe BCRP), laniquidar y elacridad.



**Figura 17.** Mecanismo de acción de los inhibidores competitivos (a) y no competitivos (b). (Adaptado de Thomas y cols., 2003).

Asimismo también está en pleno desarrollo el papel de los inhibidores de la tirosín quinasa como inhibidores del fenotipo MDR. Se han realizado estudios en líneas celulares con imatinib, gefitinib y erlotinib con resultados prometedores (Yanase y cols., 2004).

# Objetives

The end points of this study are:

1. To assess the main resistance mechanisms in non small lung cancer cell lines after Paclitaxel and Carboplatin administration.
2. To determine the levels changes of multidrug resistance protein genes in blood cells from patients after chemotherapy administration with Paclitaxel and Carboplatin.
3. And finally, to examine the possible association between the expression levels of multidrug resistance protein genes in blood cells of non small cell lung cancer patients and the disease evolution, especially in relation to the chemotherapy response.

# **Material y Métodos**

## **1. LÍNEAS CELULARES.**

Todas las líneas celulares utilizadas en el estudio fueron líneas obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) del Nodo de la Red de Bancos de Tumores de Andalucía o del banco de Células del CIC (Centro de Instrumentación Científica) de la Universidad de Granada.

La línea A-549 (CCL-185™ de la ATCC) deriva de un carcinoma epitelial de pulmón y fue obtenida de un varón de 58 años de edad.

La línea A-427 (HTB-53™ de la ATCC) deriva de un carcinoma epitelial de pulmón habiendo sido obtenida de un varón de 52 años.

La línea NODO (32050004 de Nodo de la Red de Bancos de Tumores) fue obtenida a partir de una metástasis de un carcinoma de pulmón como biopsia de una muestra sólida en un paciente no sometido a tratamiento quimioterapéutico.

La línea SEM (LC00500785 del de Nodo de la Red de Bancos de Tumores) se obtuvo a partir de una muestra de seminoma testicular. Esta línea La línea crece adherida.

La línea GAS (LC00500012 (B04/8307 del Nodo de la Red de Bancos de Tumores) fue obtenida a partir de una muestra sólida de un carcinoma gástrico. La línea crece adherida.

La línea MCF-7 (ECACC 86012803) deriva de un Adenocarcinoma epitelial humano de mama a partir de una efusión pleural de una mujer caucasiana de 69 años. Las células exhiben algunas propiedades de epitelio mamario diferenciado incluyendo la síntesis de estradiol.

## **2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.**

La línea A-549 se creció en medio Ham's F12K con 2 mM de L-glutamina, con el 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow laboratorios) en calor húmedo a 60°C durante 30 min. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% y 10 ml buffer Hepes 1M pH 7.2 y suplementado con 40 mg gentamicina (Normon), 500 mg ampicilina (Llorente) y agua bidestilada hasta

1000 ml. La ratio de subcultivo recomendada fue de 1:3 a 1:8. El medio fue renovado aproximadamente 2 o 3 veces por semana.

La línea A-427 se creció en medio mínimo esencial (Eagle) con 2 mM L-glutamina y Earle's BSS (1.5 g/L bicarbonato sódico), 0.1 mM de aminoácidos y 1.0 mM de piruvato sódico sodium; SBF (suero fetal bovino) al 10%.

La línea NODO se creció en medio RPMI 1640 con 2,5% SBF. En este caso se le adicionó 1% ITS (insulin-transferrin-selenium), penicilina streptomycin (50U/ml y 50ug/ml respectivamente), anfotericina B/fungizona (1.25ug/ml) y plasmocin 0.5ug/ml.

La línea de Seminoma (SEM) se creció en medio Ham-F10 con 10% SBF, 0.1% ITS (insulin-transferrin-selenium) penicilina streptomycin (50U/ml y 50ug/ml, respectivamente) anfotericina B/fungizona (1.25ug/ml), plasmocin 0.5ug/ml y 1% Ultroser G.

La línea de carcinoma gástrico se creció en Ham-F10 con 10% SBF, 0.1% ITS (insulin-transferrin-selenium), penicilina streptomycin (100U/ml y 100ug/ml, respectivamente), anfotericina B/fungizona (2.50ug/ml), plasmocin 0.5ug/ml y 1% Ultroser G.

Finalmente, MCF-7 se creció en medio EMEM (EBSS) con 2mM Glutamina, 1% NEAA, 10% SBF inactivado o RPMI con 2mM glutamina, 10% Suero bovino fetal inactivado.

En general los medios de cultivo fueron filtrados con filtros Millex de 0,22 µm esteriles (Millipore, France), conservado en frascos esteriles y almacenado a 4°C o a -20°C dependiendo la frecuencia de su utilización.

### **3. CONGELACIÓN y DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.**

Las células fueron despegadas de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0.02%), centrifugadas a 600 x g durante 5 min y lavadas 2 veces con PBS. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron a razón de  $0.5 \times 10^6$  células por ml de medio de congelación (Tabla 1). A continuación fueron dispensadas en criotubos e introducidas inmediatamente en congelador a -80°C donde permanecieron 24 h, siendo almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido.



*Medio de congelación: suero fetal bovino (SBF), inactivado en calor húmedo a 60° C durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.*

**Tabla 1.** Medio de congelación.

Los criotubos fueron descongelados en el Banco de Líneas Celulares de Andalucía del Hospital Clínico San Cecilio mediante una descongelación progresiva. El criotubo fue lavado con alcohol al 70% pasado a un universal y añadiéndole el mismo volumen de medio de cultivo para diluir el DMSO. Se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos retirando el sobrenadante y lavando dos veces con PBS. El botón se resuspendió en medio de cultivo estéril suplementado con suero de bovino fetal descomplementado (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA). A cada línea se le suplementó con sus condiciones específicas de cultivo.

#### **4. AGENTES FARMACOLÓGICOS.**

El paclitaxel y el carboplatino fueron suministrados por el Servicio de Farmacología del Hospital Virgen de la Nieves de Granada. Los dos agentes fueron adicionados a los cultivos celulares a la concentración plasmática (CP) que se alcanza en pacientes afectos de cáncer de pulmón y sometidos a este tipo de tratamiento (Marsh y cols., 2008). Además, se realizó un estudio utilizando una concentración superior a la plasmática (CSP) y una concentración inferior a la plasmática (CIP) de la indicada tanto para paclitaxel como para carboplatino.

#### **5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Los cultivos celulares de las diferentes líneas analizadas fueron expuestos a diferentes dosis de los agentes carboplatino y paclitaxel, de uso habitual en el tratamiento de cáncer de pulmón no células pequeñas. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos, a razón de 30.000 células/pocillo,

con 2 ml de medio. Los estudios se realizaron cuando los cultivos alcanzaron el 50-70% de confluencia.

Los estudios de proliferación fueron realizados ajustando la dosis en el medio de cultivo a las concentraciones plasmáticas encontradas en los pacientes afectos de cáncer y sometidos a tratamiento. Se utilizó paclitaxel a una concentración de 5microM y carboplatino a una concentración de 30microM (Marsh y cols., 2008; Fukuda y cols., 1999). Los tiempos de exposición fueron entre 3 y 72 horas. Se utilizaron concentraciones superiores e inferiores con el objeto de determinar modificaciones en la proliferación y apoptosis.

Para medir los cambios en la proliferación celular provocados por la presencia del fármaco en el cultivo se escogió el método del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Este método permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. La metabolización solo es realizada por parte de células viables mientras que no consiguen metabolizarlo aquellas cuya maquinaria celular se encuentra parada o aquellas que han muerto. La viabilidad celular se determina midiendo la reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial a partir del reactivo MTT que genera un producto medible colorimétricamente, denominado sal de formazán. Esta sal es un compuesto cromogénico insoluble en medio acuoso, pero soluble en DMSO y que se puede utilizar como medida de la viabilidad celular.

Se realizaron curvas de viabilidad celular en placas de 96 pocillos (tras un análisis del número de células idóneo en función de su tasa de crecimiento) con un volumen aproximado de 200 µl de medio por pocillo. Se añadieron 20 µl por pocillo de una disolución de MTT de 5 mg/ml. Se incubaron las células con el MTT durante una hora a 37 °C en el incubador de forma que las células viables metabolizan el compuesto y producen la sal formazán mientras que las no viables no consiguen metabolizarlo. Se extrajo cuidadosamente los sobrenadantes procurando no tocar la parte plana de los pocillos donde se encuentran las células. Se añadieron 100 µl de DMSO para disolver la sal formazán. Se dejaron las placas en agitación durante 10 min para completar el proceso de disolución. La densidad óptica fue medida mediante un

colorímetro Titertek multiscan a 570 y 690 nm. Los valores de densidades ópticas obtenidas en el Titertek fueron transformados en el correspondiente valor de número de células, mediante el empleo de una recta de regresión ajustada anteriormente, considerando valores conocidos de número de células y sus densidades ópticas resultantes. El programa estadístico utilizado para la realización de la recta de regresión fue el Statgraphics plus para Windows v.5.1, (Statistical Graphics Corp, 2000).

## **6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR.**

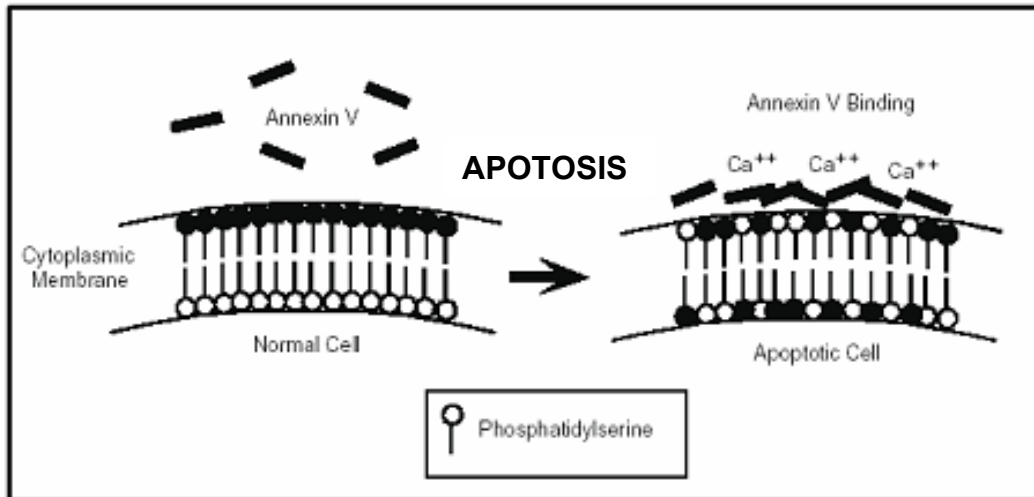
Todos los cultivos, tanto de las células control como de las células tratadas con los diferentes fármacos a diferentes concentraciones, fueron sometidos a un exhaustivo examen morfológico mediante su seguimiento con microscopio óptico Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc. NY, USA.). El análisis valoró las modificaciones en la forma de las células y en crecimiento en placa de las diferentes líneas a lo largo de todos los tiempos de exposición (8, 24, 48 y 72h). Las determinaciones fueron realizadas por dos observadores distintos y al menos en cinco réplicas de cada una de las experiencias diseñadas. El estudio se completó con el seguimiento observacional durante varias semanas de los cultivos en los que aparecieron núcleos de proliferación que mostraban crecimiento normal y por tanto resistencia a la acción de los agentes farmacológicos empleados en el estudio.

## **7. ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE APOPTOSIS.**

Los diferentes tipos celulares utilizados en nuestro estudio y sometidos a diferentes tipos de tratamiento fueron sometidos a estudios de apoptosis que se realizó mediante la técnica de la anexina V. En los primeros estadios de este proceso se produce la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática aunque la integridad de la membrana se mantiene, es decir, la semipermeabilidad se encuentra presente. Uno de esos cambios es la distribución de la fosfatidil-serina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula y que, al activarse el proceso de

apoptosis, se transloca a la membrana externa. Uno de los métodos que permiten detectar la presencia o ausencia de fosfatidil-serina en el exterior de la membrana celular es el que utiliza Anexina V. Esta es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana celular. Tiene afinidad por la fosfatidil-serina por lo que quedan marcadas con Anexina V aquellas células que se encuentren en apoptosis.

La detección de Anexina V se acompañó de una tinción con Ioduro de Propidio (IP), para asegurar que la integridad de la membrana celular se mantiene intacta. En caso contrario, se obtendría un marcaje positivo para Anexina V pero sería debido a que la membrana celular, al estar deteriorada, perdería su condición de impermeable a muchas sustancias permitiendo la entrada en el interior de la Anexina V y, en consecuencia, el marcaje de la fosfatidilserina desde el interior de la misma. La combinación de IP y de Anexina V en la misma medida citométrica nos permite diferenciar células en apoptosis temprana de células en apoptosis tardía o en necrosis (Figura 1).



**Figura 1.** Detección de apoptosis por técnica de anexina V e IP.

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos de forma que cuando alcanzaron una confluencia entre el 50-60% fueron sometidas a tratamiento durante 48 horas de paclitaxel, carboplatino y paclitaxel-carboplatino de forma conjunta. Se utilizó la concentración plasmática para realizar todas las experiencias. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para la realización del maracaje con anexina se prepararon los buffers (Annexin V Incubation Reagent y Buffer de unión). Las células en cultivo se recogieron por centrifugación 500 x g, 5 -10 min. a 18 - 24° C. Se lavaron y se resuspendieron en 500 µL 1X PBS frío y se volvieron a centrifugar. Se resuspendieron en el reactivo de incubación con Annexina V, preparado previamente a una concentración de  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cells/100 µL. Se incubó 15 min. en una cámara oscura a temperatura ambiente. Finalmente se le añadió 400 µL 1X de Buffer de unión y se analizó mediante fluorocitómetro antes de una hora (Figura 3).

Buffers: 100 µL Buffer de incubación de anexina: 10X Buffer de unión 10 µL, ioduro de propidio 10 µL, Annexina- V-FITC 1 µL y H<sub>2</sub>O 79 µL.

Buffer de unión: 50 µL of 10X Buffer de unión (1:10) *buffer* (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4) en 450 µL de agua. Guardar en hielo.

**Tabla 2. Buffers empleados.**

## **8. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE MICROSCOPIO CONFOCAL.**

Los reactivos utilizados se preparan de la misma forma que en el proceso anterior. La visualización de células adherentes mediante el microscopio confocal se realiza retirando el medio de cultivo de los frascos en los que previamente se ha depositado un cubre para el crecimiento de las células. Una vez seleccionados los cubres con los núcleos celulares en crecimiento se procede a añadir sobre ellas 300 - 500 µL de PBS frío para lavarlas. Retirar el PBS muy cuidadosamente y añadir 100 µL of Annexin V Incubation Reagent encima de la muestra hasta que se cubra completamente. Incubar durante 15 minutos en cámara oscura. Lavar dos veces durante 2 minutos con 1X Binding Buffer. Poner un medio de montaje adecuado para la visualización con el microscopio. Las células marcadas fueron analizadas mediante un microscopio confocal Microscopio Invertido Leica DMI6000 del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

## **9. DETERMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES.**

El estudio de la expresión de genes de resistencia en las diferentes líneas celulares se llevó a cabo utilizando la técnica de RT-PCR y la cuantificación mediante densitometría.

### **9.1. Extracción de ARN de los cultivos celulares.**

Se utilizaron cultivos de  $10^6$ - $10^{10}$  células que fueron despegadas mediante PBS-EDTA, lavadas con PBS a 4°C dos veces y posteriormente centrifugados a 600 x g durante 10 min, obteniéndose un pellet celular. La extracción de RNA se llevo a cabo mediante el kit Rneasy Mini kit (Qiagen). El pellet obtenido fue resuspendido en 50 µl de agua bidestilada estéril y calentado a 60°C durante 5 min para conseguir la completa disolución. Tras una centrifugación de 3 min se desechó el pellet (impurezas) y se pasó el sobrenadante a otro tubo. Cuando fue necesario se procedió a la precipitación del ARN mediante 1/10 de acetato sódico 3 M pH 5.2, 2 volúmenes de etanol absoluto y manteniendo la muestra a -20°C durante 12 h. El precipitado se recogió por centrifugación a 13.000 x g en microcentrífuga a 4°C durante 15 min. Tras desechar el sobrenadante se dejó secar el pellet y se disolvió en agua bidestilada y estéril. La concentración fue determinada por espectrofotómetro de ultravioletas a una densidad óptica de 260 nm.

Para obtener controles positivos de la expresión de genes de resistencia y siguiendo el protocolo de Atsuko y cols., 2001, se obtuvo tejido de placenta (Servicio de Ginecología, Hospital Universitario Virgen de la Nives, Granada) que fue inmediatamente congelado a -80°C y procesado para obtener ARNm de la misma forma que se ha descrito anteriormente.

## **9.2. Determinación de la integridad del ARN**

Un  $\mu\text{gr}$  de ARN fue analizado por electroforesis a 80 V durante 2 h en un gel de agarosa al 1%. La visualización del ARN por transiluminador de ultravioletas nos permitió comprobar que no se encontraba degradado.

## **9.3. Transcriptasa reversa**

A partir de RNA total se procedió a la síntesis del cDNA que fue generado mediante Promega Reverse Transcription System (Promega, Madrid, Spain) usando 1 $\mu\text{g}$  de RNA. Cada tubo de reacción contenía un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  compuestos de:

- ARN total (1 $\mu\text{gr}$ )
- tampón de transcriptasa reversa 10X
- proteína inhibidora deRNAsa
- transcriptasa reversa
- poli T
- desoxirribonucleótidos trifosfato
- Agua hasta 20  $\mu\text{l}$

Los tubos fueron calentados a 94°C durante 2 min para desnaturalizar el ARN y rápidamente fueron enfriados en hielo. La reacción de la transcriptasa reversa tuvo lugar a 42°C durante 15 min. Tras este periodo los tubos fueron enfriados 5 min en hielo.

## **9.4. Reacción en cadena de la polimerasa**

El resultado de la transcriptasa reversa fue diluído al 1/10 en agua destilada. Se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  para la reacción en cadena de la polimerasa. Cada tubo de reacción contenía:

- resultado de la transcriptasa reversa (10  $\mu\text{l}$ )
- buffer de Taq polimerasa 10X
- desoxirribonucleótidos trifosfato

- primers
- taq polimerasa
- Agua hasta 25 µl

Los primers utilizados fueron preparados por la empresa Master Diagnóstica S.L. de Granada que los suministró liofilizados. Para su reconstitución se centrifugaron en el ependorff y se añadió un volumen apropiado de TE. Se rehidrató durante dos minutos, y se agitó en vortex durante 15 segundos. La reconstitución fue realizada para obtener una concentración de 50 pmoles/microl. Se almacenaron a -20°C.

Para poder realizar cuantificación de la PCR el protocolo de amplificación se llevó a cabo mediante 28 ciclos en base a las experiencias previas de nuestro grupo (Pradosy cols., 1999), lo que permitió llegar a la fase de saturación.

Los primers con los que se realizaron los ensayos fueron los siguientes:

MDR1. Sense: **5' ATATCAGCAGCCCACATCAT 3'**. Antisense: **5' GAAGCACTGGGATGTCCGGT 3'**. El fragmento amplificado fue de 203pb. Las condiciones que se probaron para los ciclos de PCR fueron 30 seg 94°C, 30 seg 58°C y 30 seg de extensión a 72°C. La amplificación fue realizada con 35 ciclos con una extensión final de 7 min a 72°C.

MRP3. Sense: **5' GAT ACG CTC GCC ACA GTC C3'**. Antisense: **5' CAG TTG GCC GTG ATG TGG CTG3'**. El fragmento amplificado fue de 262 pb. Las condiciones que se probaron para los ciclos de PCR fueron 0.5min 94; 1 min 64°; 1 min 72° (28-45 ciclos) (Kawai, 2002) y 1min 94°; 1 min 50°; 3 min 68° (28-33 ciclos) (Young, 1999).

BCRP. Sense: **5'TGC CCA GGA CTC AAT GCA ACA G 3** y Antisense: **5' ACA ATT TCA GGT AGG CAA TTG TG3'**. El fragmento que amplifica es de 172 pb. Las condiciones que se probaron para los ciclos de PCR fueron 30 seg 94°; 30seg 55°; 1 min 72° (35 ciclos) (Kansaki, 2001).

LRP. Sense: **5' CCC CCA TAC CAC TAT ATC CAT GTG 3'** y Antisense: **5' TCG AAA AGC CAC TCA TCT CCT G 3'**. El fragmento amplificado fue de



405pb. Las condiciones que se probaron para los ciclos de PCR fueron 30 seg 94°; 30seg 55°; 1 min 72° (35ciclos). (Kansaki 2001; Nakayama 2002).

Los correspondientes al cDNA de beta-actina fueron: sense **5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA3'** y antisense:**5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 5'** . El fragmento amplificado fue de 262pb. Las condiciones que se probaron para los ciclos de PCR fueron 30 seg 94°C, 30 seg 55°C y 30 seg de extensión a 72°C. La amplificación fue realizada con 35 ciclos con una extensión final de 7 min a 72°C.

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 80 V durante 2 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio y examinado mediante transiluminador de ultravioleta. Las bandas fueron sometidas a estudio densitométrico comparando la señal obtenida de la amplificación del gen *mdr1* con la correspondiente a la de beta-actina en cada una de las muestras. Para ello las imágenes fueron escaneadas y analizadas usando el sistema de documentación de Quantity One Analysis Software, lo que permitió obtener la expresión relativa de *mdr1* como la razón entre *mdr1*/beta-actina, modo en el que se expresaron los resultados.

## **10. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PACIENTES AFECTOS DE CPCNP.**

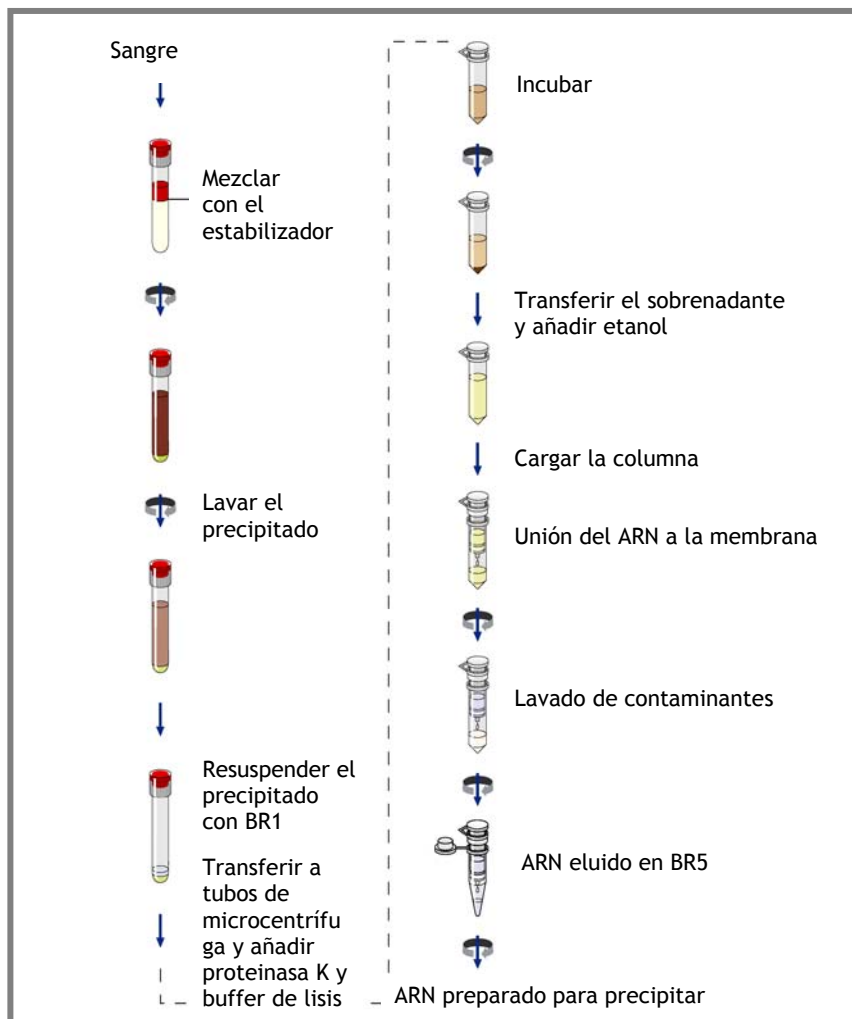
Con el objeto de determinar si la aplicación de dosis terapéuticas de la combinación paclitaxel-carboplatino en pacientes afectos de cáncer de pulmón eran capaces de provocar alteración de la expresión de genes relacionados con la resistencia a drogas se realizó un estudio mediante array utilizando el RNA obtenido de sangre periférica. Como aproximación al estudio se seleccionaron dos pacientes, estudiando su ARN antes y después del tratamiento (21 días) y comparándolo con sujetos sanos sin patología.

### **10.1. Aislamiento del ARN para array**

El material empleado para el manejo de ARN se ha tratado con dietil-pirocarbonato (DEPC) al 1% y, posteriormente, se ha autoclavado para evitar cualquier posible contaminación con ribonucleasas (RNAsas).

Para el aislamiento de ARN total a partir de la fracción leucocitaria, se recogieron 2,5 ml de sangre total en tubos PAXgene Blood ARN (Becton Dickinson-Qiagen), que contienen agentes lisadores celulares y agentes estabilizadores del ARN. Para obtener la suficiente cantidad de ARN se extrajeron de cada individuo 4 tubos Paxgene Blood. El proceso de purificación se realizó siguiendo las instrucciones del kit PAXgene Blood ARN (Qiagen). Los tubos se centrifugaron (15 minutos a 5.000 g) para la obtención del precipitado de ácidos nucleicos. Una vez precipitados, se resuspenden en 5 ml de H<sub>2</sub>O destilada libre de RNasas y se volvieron a centrifugar durante 10 minutos a 5.000 g. A continuación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 360µl de tampón BR1 y se mezcló vigorosamente hasta que la solución quedó homogénea. Seguidamente, el volumen resuspendido se transfirió a tubos de microcentrífuga a los que se les añadió 300µl del tampón BR2 y 40µl de Proteínasa K para la digestión de las proteínas mediante una incubación a 55°C durante 10 minutos. Una vez digeridas las proteínas se procedió a centrifugar los tubos de microcentrífuga durante 3 minutos a 14.000 rpm y se transfirió de nuevo el sobrenadante a otros tubos de microcentrífuga a los que, posteriormente, se les añadió 350µl de etanol absoluto para ajustar las condiciones de unión del ARN a la membrana de silicagel de las columnas de purificación suministradas en el kit. Acto seguido, se transfirió el volumen a las columnas PAXgene del kit y se centrifugaron 1 minuto a una velocidad de 14.000 rpm. Descartamos el sobrenadante y comenzamos a lavar las membranas de las columnas primero con 700 µl de BR3 y, después, con 2 lavados consecutivos con 500 µl de BR4. Entre lavado y lavado las columnas se centrifugaron durante 1 minuto a 14.000 rpm. Para incrementar el rendimiento de elución del ARN se realiza una última centrifugación de 2 minutos a 14.000 rpm para secar completamente la membrana de silicagel de la columna y se procedió a la elución del ARN mediante dos lavados con 40 µl de tampón de elución BR5. Tras cada lavado, las columnas se centrifugaron durante 1 minuto a 14.000 rpm para obtener un volumen final de 80 µl de cada columna. Finalmente, se mezcló el volumen obtenido de las 4 columnas de cada individuo (volumen total de 320 µl de RNA)

y se incubó durante 5 minutos a 65 °C. Tras la incubación las muestras se almacenan a -80 °C para posteriores aplicaciones (ver Figura 9)



**Figura 2.** Descripción del método utilizado para la extracción de ARN total. PAXgene® Blood RNA Kit (Preanalytix, Becton Dickinson, Qiagen)

## 10.2. Precipitación y Cuantificación del ARN

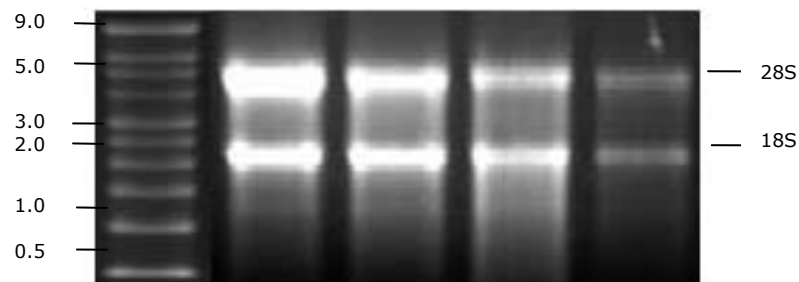
La precipitación del ARN comenzó con el ajuste del volumen de ARN eluido en BR5 (320 µl) a un volumen final de 360µl en agua destilada libre de RNasas. A los 360µl se les añadieron 40 µl de acetato sódico (2M y pH 4,0) hasta un volumen final de 400µl. A continuación, a la muestra se le añadió 1 volumen de isopropanol (400 µl) y se incubó durante toda la noche a -20° C. Posteriormente, la muestra se centrifuga 10 minutos a 4 °C y 12.000 rpm y se

descarta cuidadosamente el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol al 70% y, tras otra centrifugación en las mismas condiciones (10 minutos a 4°C y 12.000 rpm), vuelve a descartarse nuevamente el sobrenadante. El sedimento se dejó secar durante 15-30 minutos y se resuspendió en 12 µl de agua libre de RNasas. Tal y como ya hemos descrito previamente la concentración de ARN se determina espectrofotométricamente midiendo a una longitud de onda de 260 nm (1 unidad de absorbancia a esa longitud de onda corresponde a una concentración de 40 µg/ml). Además, estimamos la pureza de ARN respecto a posibles contaminantes proteicos determinando el cociente establecido entre 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) que debe de hallarse entre 1.8-2.1.

### **10.3. Determinación de la calidad del ARN**

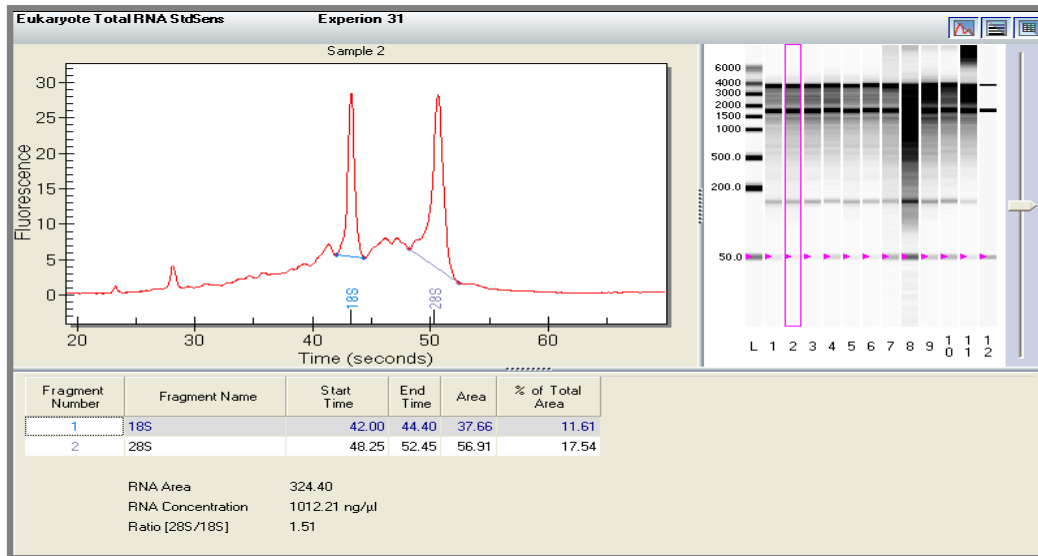
Dada la importancia de la calidad del ARN para la realización del estudio de array y a diferencia del proceso seguido para determinar la calidad del ARN para PCR, en este caso se utilizaron dos sistemas, utilizándose en los dos el ARN ribosómico para inferir la calidad del ARN mensajero, ya que del ARN total, el ribosómico constituye más del 80% y el mensajero solo entre el 1-3%, lo que hace imposible su detección directa.

*Determinación en gel de agarosa formaldehído:* La determinación de la calidad del ARN en geles de agarosa desnaturalizante se basa en la aparición de dos bandas a diferente altura e intensidad que se corresponden con el ARN ribosomal 28 y 18S (Figura 3). Se considera que el ARN es de calidad cuando la banda 28S presenta el doble de intensidad que la de 18S y cuando el ARN estaba degradado se observaba un “smear” entre las dos bandas. El sistema en gel de agarosa desnaturalizante incluye formaldehído y tampón MOPS para desnaturalizar el RNA y que sus moléculas corran en la electroforesis según su tamaño. Las bandas 28 y 18S se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa- formaldehído al 1% y las condiciones de la electroforesis han sido de 5 V/cm a voltaje constante durante 45 minutos.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa formaldehído. Para considerar una muestra de ARN como una muestra de calidad, el tamaño que deben tener las bandas 28 y 18S es de 5 y 1,9 Kb, respectivamente.

*Determinación en el bioanalizador Experion® (Bio-Rad).* El Experion es un sistema de electroforesis automatizado basado en la tecnología de microfluídica. La pieza clave del Experion es el gel que contiene una serie de pocillos de plástico unidos a una superficie de cristal que está conectada a una red de microcanales que interseccionan con cada uno de los pocillos. Cuando estos canales se ceban por el gel y se cargan las muestras de ARN, la estación de electroforesis conduce cada muestra por un microcanal aplicando un voltaje preciso. El Software del Experion genera electroferogramas que nos permiten analizar la calidad del ARN. Primero se genera el electroferograma de los marcadores de ARN (ladder) en el que se identifican nueve picos a diferentes tamaños. Después, se genera el electroferograma de la muestra de ARN donde se observan dos picos de pequeño tamaño que corresponden a un marcador interno y al ARN ribosomal 5S, y dos picos mayores que corresponden al ARN 18S Y 28S respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Resultado obtenido del análisis de una muestra de ARN total con el bionalizador Experion de Bio-Rad.

#### 10.4. Análisis del perfil de expresión génica por Bioarrays. Principio del ensayo.

El análisis del perfil de expresión génica se ha llevado a cabo mediante la técnica de microarrays que permite medir simultáneamente el nivel de ARN mensajero (ARNm) de un elevado número de genes. Las muestras de ARN se analizaron con la plataforma CodeLink® Expression Bioarray System (Applied Microarrays, Tempe AZ, USA). Los genes contenidos en cada bioarray se pueden clasificar según los procesos biológicos en los que intervengan empleando la base de datos Gene Ontology Consortium.

El diseño de cada bioarray de CodeLink® consiste en una superficie cristalina recubierta por una matriz tridimensional de un gel acuoso. El cristal es sometido a un fotoacoplamiento de un prepolímero hidrofílico de acrilamida que proporciona una superficie de unión, gracias a la presencia en su interior de un éster activado. Este polímero está covalentemente unido a sí mismo y a la superficie de cristal y proporciona el sitio de unión para los C6-aminooligonucleótidos que son depositados sobre el polímero por robots dispensadores piezoeléctricos (Ramakrishnan y cols., 2002; Hughes y cols., 2001).

Esta matriz va a proporcionar un ambiente acuoso que permite a la diana de oligonucleótidos estar separada del soporte cristalino y así maximizar la interacción con la sonda marcada procedente de la muestra (Hughes y cols., 2001). El tipo de ácido nucleico inmovilizado sobre el soporte es un oligómero de 30 bases presintetizado y fabricado mediante el método de deposición.

Los microarrays empleados en los experimentos son los bioarrays de la plataforma tecnológica Codelink UniSet Human Whole Genome que contienen 56.881 dianas descubiertas y recogidas en las bases de datos públicas UniGene and RefSeq e Incyte's LifeSeq Gold. Además, contienen 300 oligos correspondientes a controles negativos y 108 oligos de controles positivos obtenidos de secuencias bacterianas (<http://www.appliedmicroarrays.com>).

El proceso de determinación del perfil de expresión génica por microarrays se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual de CodeLink® Gene Expression System (Applied Microarrays)

*10.4.1. Hibridación del array.* Para una correcta hibridación del array, el ARNc se debe fragmentar hasta unos tamaños aproximados de 100 a 200 pb. Para ello, se parte de una cantidad de 10 µg del ARNc purificado que se mezclan con 5µl tampón de fragmentación y se incuban 20 minutos a 94° C. Durante la incubación se prepara la mezcla de reactivos para la posterior reacción de hibridación: 78 µl del componente A del tampón de hibridación y 130 µl del componente B. La solución de hibridación y el ARNc fragmentado se llevan a un volumen final de 260 µl con agua libre de ribonucleasas y se incuba durante 5 minutos a 90 °C para su desnaturalización. A continuación, se cargan 250 µl de la mezcla de hibridación en el array. Una vez cargado el array se sellan los puertos de la cámara de hibridación con tiras de sellado de 1cm y se introduce sobre un soporte en el agitador orbital Innova® 4080 (New Brunswick). La hibridación en el agitador orbital dura 18 horas y se realiza a una velocidad de 300 rpm y 37 °C.

*10.4.2. Post-hibridación del array.* Una vez concluída la fase de hibridación, el array se saca del agitador y se retira de cada array la cámara de hibridación. El cristal del array se lava con tampón TNT 0,75X (0,1M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,05% de Tween® 20) a temperatura ambiente y después se incuba a 46 °C durante 1 hora en tampón 0,75x TNT precalentado

a igual temperatura durante al menos 16 horas. La detección de la señal se hizo empleando una dilución 1:500 de streptavidina (Cy5-Streptavidin) en tampón TNB (0,1 M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,5% de reactivo de bloqueo (NEN Blocking reagent, Perkin-Elmer). En esta solución cada array se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de marcaje se elimina lavando cada array cuatro veces durante cinco minutos en tampón 1xTNT. Finalmente, se realiza un lavado con 0,1X SSC/0.05 % Tween® (Biorad) durante 30 segundos y cada array se seca por centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos. Llegado este punto el array está preparado para ser escaneado. El escáner de cada array se realiza con el escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) mediante un láser a 635 nm, un voltaje de tubo fotomúltiple (PMT) de 600 V y una resolución de 10µm. El escáner utiliza el CodeLink® Expression Scanning Software (Applied Microarrays) y las imágenes de cada cristal se analizan posteriormente con el CodeLink® Expression Analysis Software v4.1 (Applied Microarrays).

*10.4.3 Análisis estadístico empleado en el estudio de microarrays.* Para el análisis de los resultados de perfiles de expresión génica se ha procedido utilizando los valores absolutos de intensidad (raw data) obtenidos en cada microarray por el software CodeLink (Applied Microarrays, Tempe AZ, USA) v4.1. A estos valores se les ha aplicado una corrección basándose en el valor del fondo (“background”) para disminuir los efectos del mismo. Además se han normalizado los datos de cada microarray para poder compararlos convenientemente (normalización usando la mediana). Tras ésto se ha procedido a hallar el coeficiente de expresión de cada microarray de prueba con respecto al de referencia. Los valores finales se obtienen obteniendo el logaritmo de dichos coeficientes ya que así se obtienen los genes sub-expresados como valores negativos y los expresados como positivos además de re-escalar los valores para hacerlos más comparables unos con otros.

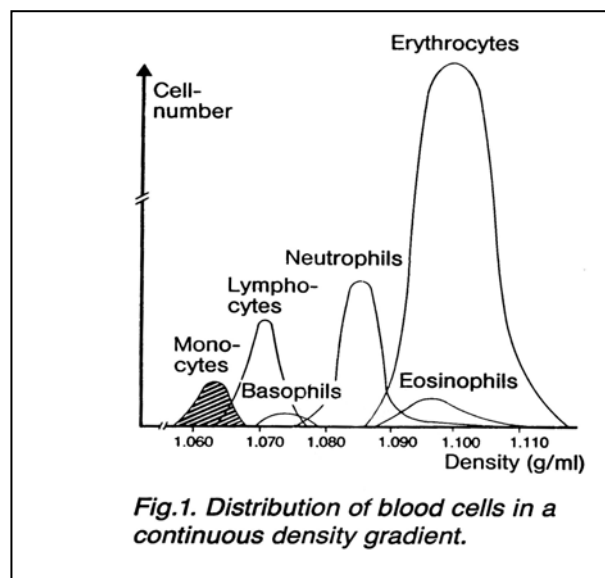


## **11. PACIENTES. GRUPO DE ESTUDIO**

El estudio clínico fue realizado en pacientes diagnosticados de CPCNP, mediante biopsia o citología, que no habían recibido quimioterapia previamente, e iban a iniciar tratamiento según el esquema Paclitaxel-Carboplatino, en la Unidad de Oncología Médica del H.U. Virgen de las Nieves. Se incluyeron 26 pacientes desde Abril de 2004 a Julio 2007. Todos los pacientes fueron debidamente informados del estudio y dieron su consentimiento por escrito. Tres pacientes salieron del estudio, en un caso por recibir otro esquema de quimioterapia (Gemcitabina) y en dos ocasiones por no poder obtener muestra (PMN) suficiente.

## **12. AISLAMIENTO DE PMN DE SANGRE PERIFÉRICA**

El aislamiento de PMN se realizó en base a las diferentes densidades que presentan cada uno de los tipos celulares de la sangre (esquema). La muestra de sangre obtenida de los pacientes (3 ml) se diluyó 1/2 con suero salino al 0,9% y se depositó sobre Lymphoprep (3ml) (Axis-Shield, Norway) (densidad 1.077 g/ml). El ficoll aglutina los eritrocitos, de manera que aumenta su velocidad de sedimentación. El metrizoato sódico es el compuesto que da la densidad adecuada. Las muestras de sangre fueron pipeteadas cuidadosamente y depositadas sobre medio volumen de Lymphoprep (6ml sangre diluida: 3ml de Lymphoprep) evitando que la sangre y el medio de separación se mezclaran. Se centrifugó a 800g x 30 min a temperatura ambiente (en un rotor oscilante (cuando la sangre se obtuvo con más de 2 horas se centrifugó 30 min). Una vez realizado este proceso, se recogió la fracción mononuclear y se diluyó con suero salino (6ml). Se centrifugó a 250g x 10 min. y se decantó o aspiró el sobrenadante (rico en plaquetas). El proceso de lavado se repitió dos veces. Finalmente el pellet celular que se obtuvo mediante centrifugación a 800g x 30 min, se resuspendió en PBS.



**Figura 5.** Distribución de las células sanguíneas según densidad de gradiente

### 13. DETERMINACIÓN DE MDR1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES

Con el objeto de determinar la influencia del tratamiento clínico de carboplatino y paclitaxel en pacientes afectados de CPCNP en la expresión de la resistencia mediada por *mdr1* en sangre periférica, se realizó un estudio semicuantitativo de las modificaciones de MDR1. Para ello, se obtuvieron PMN del grupo de pacientes en estudio a partir de muestras de sangre heparinizada (5ml). Dichas muestras fueron tomadas antes y después del tratamiento (0-6h). Dicho tratamiento consistió en la administración mediante infusión intravenosa de carboplatino y paclitaxel en las siguientes dosis: Carboplatino AUC5-6 y Paclitaxel 175-200mg/m<sup>2</sup>, día 1 cada 21 días.

Los PMN obtenidos fueron congelados a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Se incluyeron en RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) para evitar la degradación del ARN. El procesamiento del pellet de PMN para la obtención del RNA se realizó mediante el protocolo de Trizol (Sigma). A cada pellet se le agregó 750 µl de Trizol (Sigma). Se homogenizó mediante una jeringa de insulina (5 veces) y se pasó a un eppendorf de 1,5 ml (lavados con NaOH). Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó

200 µl de cloroformo. Se agitó vigorosamente por 60 seg. Posteriormente se incubó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a 20000 x g a 20°C. El resultado fue la obtención de una fase acuosa (superior, alrededor de 400 µl) que se pasó a un tubo nuevo al que se le agregó 400 µl de alcohol isopropílico (-20°C). Se agitó e incubó 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó 10 min a 20000x g a 20°C. El sobrenadante fue eliminado por inversión y se lavó el pellet (ARN) con 1 ml de etanol 70%. Una vez seco el pellet (ARN) evitando deshidratación total (por inversión sobre papel absorbente), se resuspendió en 20 µl de agua desionizada y se separó una alícuota para medir absorbancia en espectrofotómetro. El resto de la muestra se congeló a -80°C. A partir de aquí, los ARN se chequearon en geles de agarosa y una vez determinada su no degradación se procedió a la realización de una RT-PCR.

En este caso las muestras fueron procesadas sólo para la determinación de la expresión de *mdr1* para lo que se utilizaron los primers antes mencionados y las condiciones específicas para la amplificación de este gen.

#### **14. ESTUDIO ESTADÍSTICO.**

Una vez obtenidos los valores de la expresión de *mdr1* en sangre periférica de pacientes afectos de CPCNP, antes y después del tratamiento, se procedió a realizar un estudio estadístico con el objeto de correlacionar estos valores con las diferentes variables del grupo de estudio. A partir del software estadístico SPSS 15.0 para Windows se realizó el siguiente análisis:

En un primer momento se hizo un análisis descriptivo de las variables recogidas de los pacientes a estudio. Se calcularon medias y desviaciones típicas para las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas.

Posteriormente a este descriptivo de la muestra, se realizó un análisis bivariante para estudiar las posibles relaciones entre la variable dependiente, Nivel de Expresión (dicotómica) y el resto de variables independientes de interés.

El test a aplicar para el contraste de si existía o no relación entre las variables dependiente e independientes, depende del tipo de la variable independiente. Cuando la variable independiente fuese cualitativa dicotómica se corrigió el test de la Chi-cuadrado por el estadístico de Yates. Si el porcentaje de celdas con frecuencia esperada inferior a 5 era mayor del 20% la Corrección de Yates se sustituyó por el estadístico de Fisher. Sólo en los casos en que la variable independiente cualitativa tenía más de dos categorías se usó la Chi-cuadrado. En el caso de que en tablas de más de 2x2 se presentase más de un 20% de celdas con frecuencia esperada inferior a 5, se intentó solucionar reduciendo la dimensión de la variable cualitativa.

En el caso que la variable independiente fuese numérica, lo primero que se realizó fue un contraste de normalidad de estas variables en cada categoría de la variable dependiente, para ello se usó el estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Como las variables no se distribuían normalmente se usó un test no paramétrico para contrastar el Nivel de Expresión (dicotómica) y las variables numéricas (edad y nº de ciclos). Al comparar dos valores el test a uso fue la U de Mann Whitney.

Por último, se estudió la supervivencia global a través del descriptivo de Kaplan Meier y se estudiaron las posibles diferencias de supervivencia por las variables de interés aplicando el contraste de Log-Rank. Se tomaron como valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ .

# Resultados

## **1. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS DERIVADAS DE CÁNCER DE PULMON CÉLULAS NO PEQUEÑAS POR LA ACCIÓN DEL PACLITAXEL A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS.**

A diferencia de los ensayos habituales en los que se utiliza la IC50 de las drogas antineoplásicas, en nuestro estudio hemos usado las drogas paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas en los cultivos de las diferentes líneas, tanto de cáncer de pulmón como de otros tipos de tumores. Estas experiencias nos han permitido realizar una aproximación real al efecto que estos fármacos provocan no sólo a nivel de proliferación o apoptosis sino también en la modulación de la expresión génica incluyendo genes de resistencia a drogas. Utilizando concentraciones ligeramente superiores e inferiores a ésta, pudimos determinar las posibles modificaciones en sus efectos en base a la concentración de fármaco.

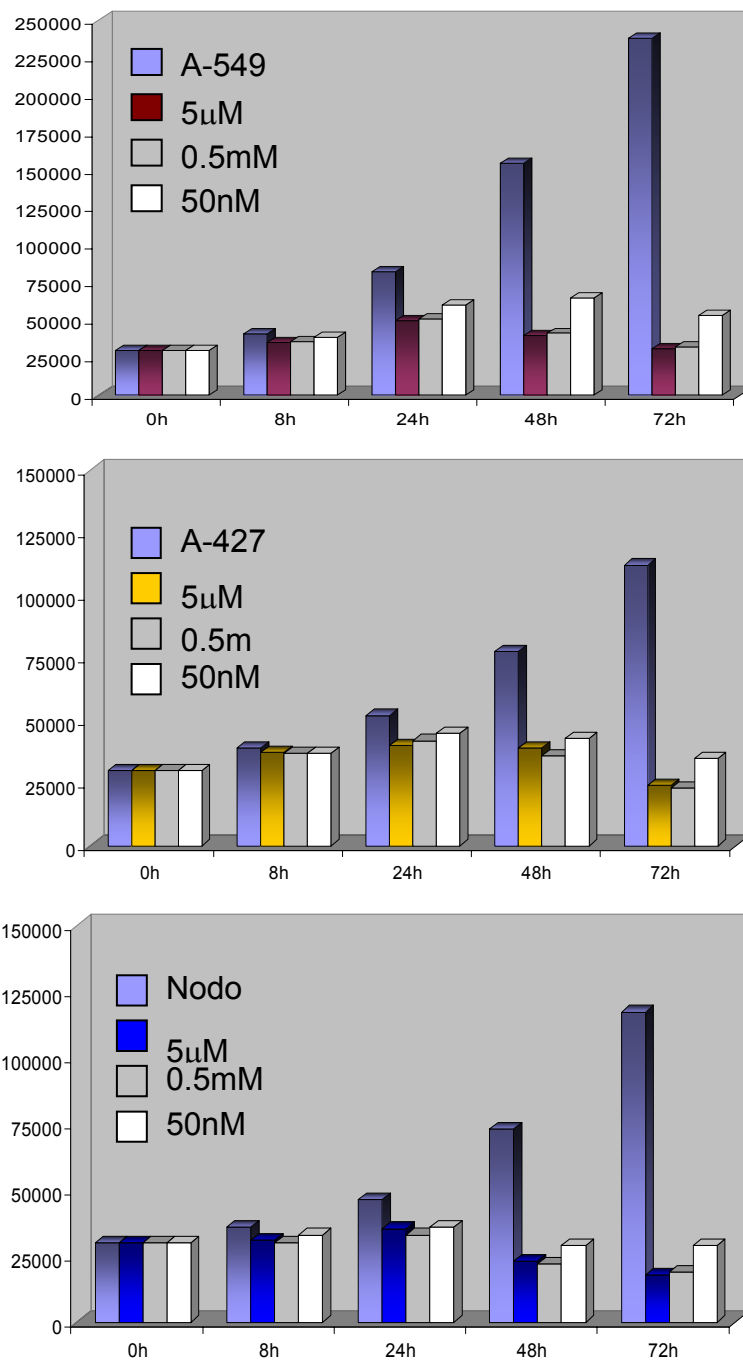
Tal y como se puede observar en la Figura 1, el paclitaxel a concentraciones plasmáticas provoca una importante reducción en la proliferación de la línea de cáncer de pulmón A-549, a partir de las 24 h (39.46%). Esta reducción se situó en un 74.19% en los estudios realizados a las 48 h y alcanzó una inhibición de la proliferación de un 86.9% cuando se analizó su efecto a las 72h. Tal y como era de esperar, dosis inferiores a las terapéuticas originaron una menor inhibición de la proliferación que también fue tiempo-dependiente (Figura 1). Sin embargo la utilización de dosis superiores, aun provocando un mayor descenso del crecimiento celular, no siguieron una pauta de carácter lineal. Así, la inhibición de la proliferación a las 24, 48 y 72 h con dosis de paclitaxel por encima de las terapéuticas fue de un 38.2, 73.3 y un 86.4% respectivamente. Estas inhibiciones fueron en todo similares a las encontradas con las dosis terapéuticas.

Estos estudios también fueron realizados en la línea A-427 que, al igual que A-549, deriva de un tumor primario de un paciente con CPCNP. Tal y como se puede observar en la Figura 1, los efectos de paclitaxel a concentraciones plasmáticas originaron una intensa inhibición de la proliferación que fue, como en el caso anterior, tiempo-dependiente. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en A-549, el mayor incremento de la inhibición de proliferación tuvo

lugar a las 48h. Este hecho habla de un posible condicionamiento del efecto del fármaco en función de las características específicas de cada línea celular incluso dentro del mismo tipo histológico. Así, el paclitaxel fue capaz de provocar tan sólo un 23.1% de inhibición de proliferación a las 24 h en esta línea, mientras que dicha inhibición se situó en casi un 50% (49.7%) cuando se determinó a las 48 h. En tiempos posteriores (72h) la inhibición alcanzó un 78.6%.

Por último, las concentraciones plasmáticas de paclitaxel fueron testadas en la línea denominada NODO y obtenida del Banco de Tumores del Servicio Andaluz de Salud (Hospital San Cecilio de Granada). Esta línea posee la particularidad de haber sido obtenida a partir de una metástasis de un paciente con CPCNP. Como se puede observar en la Figura 1, la utilización de paclitaxel a concentraciones plasmáticas indujo una intensa inhibición de la proliferación tiempo-dependiente que fue similar a la encontrada en la línea A-549. No obstante y como en A-427, el mayor incremento en la inhibición del crecimiento tuvo lugar no a las 24, sino a las 48h (68.9.1%), que se incrementó hasta un 84.8% a las 72 h. Parece pues que, al menos en lo que se refiere a estas líneas, no existe una diferencia significativa entre los efectos del paclitaxel entre células derivadas de tumor primario y de tumores metastásicos.

Como en la línea A-549, los ensayos con concentraciones menores de fármaco lograron inhibir en un menor porcentaje la proliferación celular. No obstante, el incremento en la inhibición de la proliferación con concentraciones superiores no fue significativo. Tal y como se observa en la Figura 1, los valores con esta dosis fueron similares a los encontrados con la terapéutica. La inhibición de la proliferación a las 24, 48 y 72 h con las mayores concentraciones de paclitaxel fue de un 38.2, 73.3 y un 86.4% respectivamente, en todo similares a las encontradas con las concentraciones terapéuticas: 16.6%, 28.9%, 69.9% y un 83.8% a las 8, 24, 48 y 72 h respectivamente.



**Figura 1.** Efecto del tratamiento con paclitaxel en la proliferación de líneas tumorales de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Un número de  $30 \times 10^3$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 3 días. Las células fueron sometidas a tratamiento con paclitaxel a dosis terapéuticas. Las placas fueron despegadas y contadas a las 8, 24, 48 y 72 h mediante el ensayo de la sulforodamina B. Los valores representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

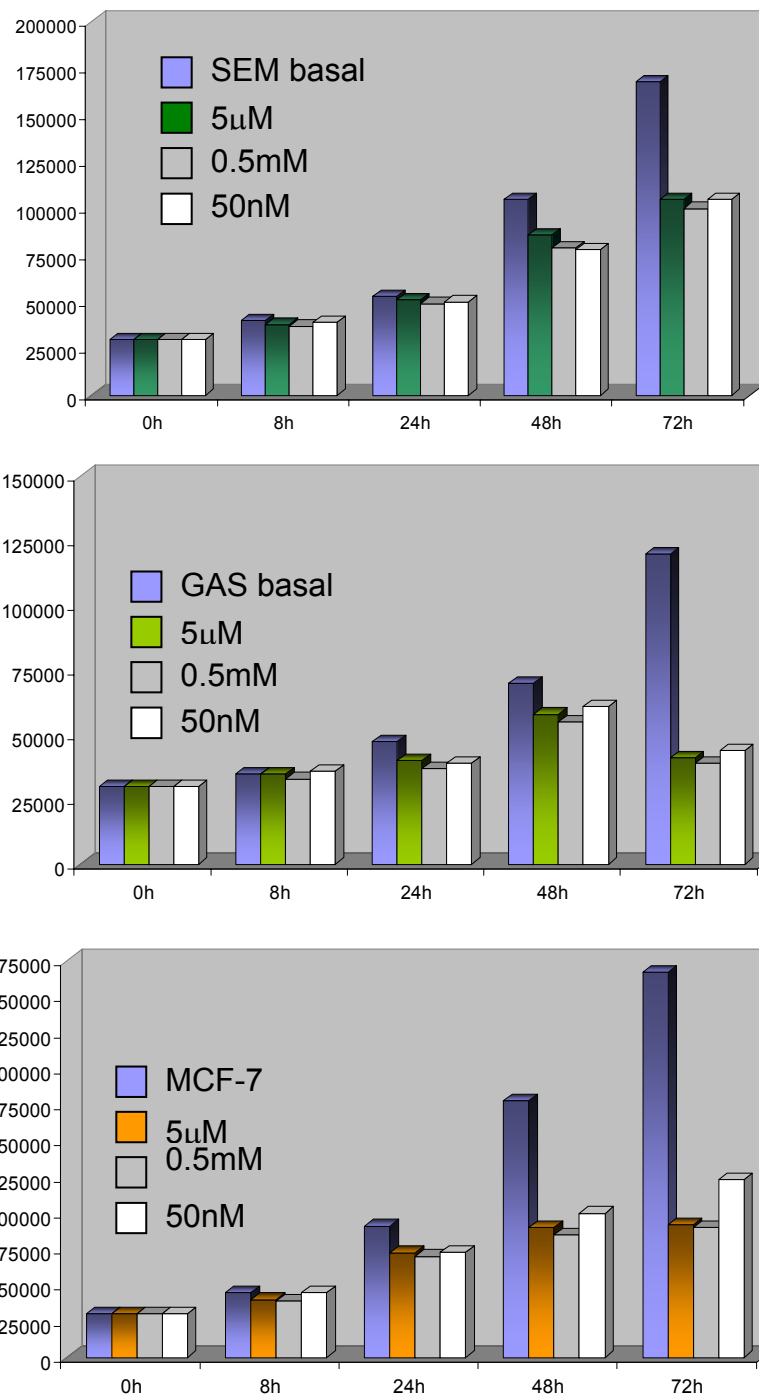


## **2. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS DERIVADAS DE OTROS TUMORES POR LA ACCIÓN DEL PACLITAXEL A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS.**

Con el objetivo de determinar la actividad que las concentraciones plasmáticas de paclitaxel pueden tener sobre células tumorales de origen histológico distinto a las de cáncer de pulmón, se analizaron los efectos del fármaco a dichas concentraciones y a una concentración mayor y menor en distintas líneas celulares: una derivada de seminoma (línea SEM), un adenocarcinoma gástrico (línea GAS) y por último en un adenocarcinoma mamario (línea MCF-7).

En general y como se observa en la Figura 2, podemos decir que el efecto del paclitaxel a concentraciones plasmáticas fue menor en las líneas SEM y GAS que en las líneas de cáncer de pulmón testadas previamente. La actividad sobre la línea de cáncer de mama se pudo considerar intermedia entre las anteriormente mencionadas. Por otra parte, al igual que en las líneas de pulmón, el incremento de la concentración de fármaco no consiguió tener un aumento lineal sobre la inhibición de la proliferación celular siendo la diferencia entre ambas dosis no significativa.

Como datos más relevantes de esta experiencia (Figura 2) podemos destacar los siguientes. Las concentraciones plasmáticas de paclitaxel inducen sobre las células de seminoma tan sólo un 37.5% de inhibición de la proliferación con el máximo tiempo de exposición (72 h), lo que está muy por debajo del efecto en cáncer de pulmón. Es interesante observar como con una exposición de 8 y 24 h, la inhibición de la proliferación es casi nula mientras que a las 48 h se alcanza sólo un 18.09%. Por otra parte, la utilización de concentraciones mayores o menores de droga no provoca prácticamente modificación en el crecimiento celular.



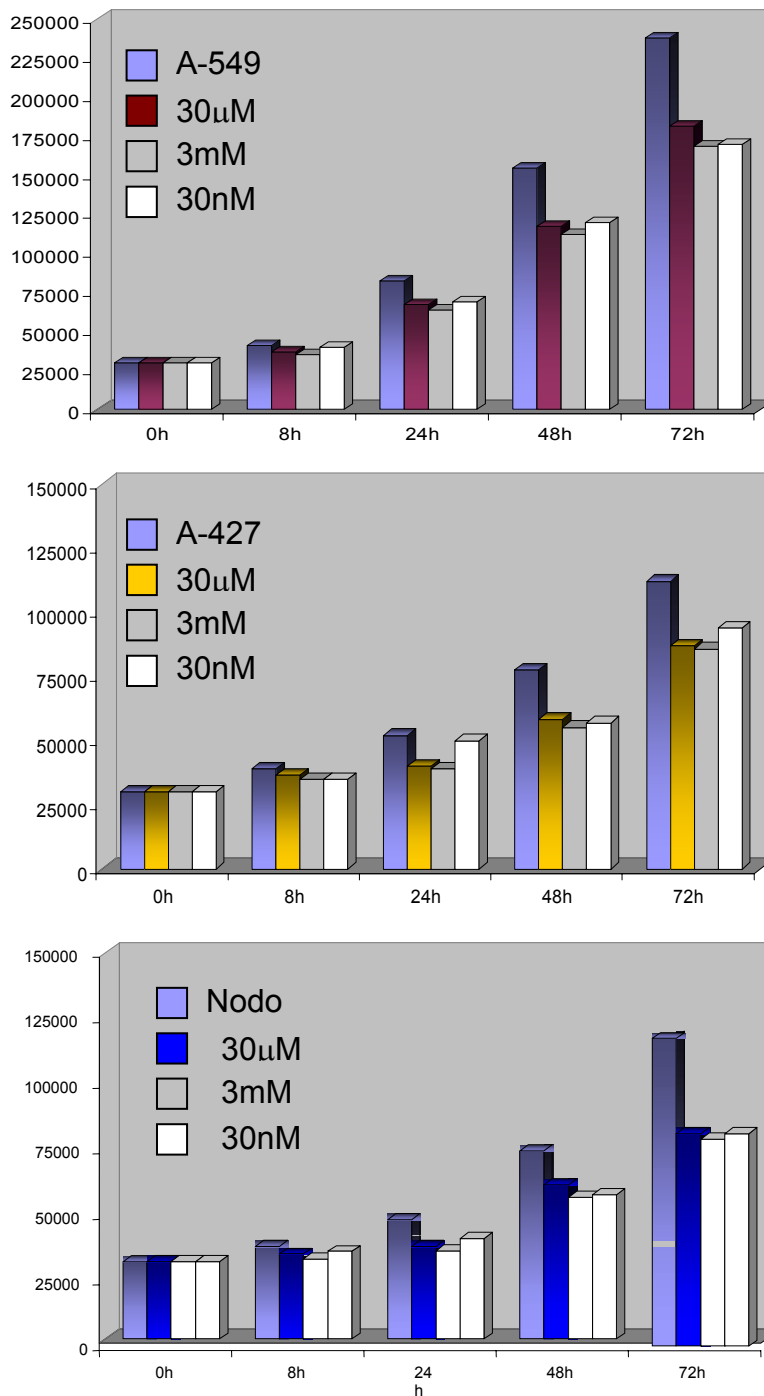
**Figura 2.** Efecto del tratamiento con paclitaxel sobre la proliferación de líneas derivadas otros tumores: seminoma (línea SEM), cáncer gástrico (GAS) y cáncer de mama (MCF-7). Un número de  $30 \times 10^3$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 3 días. Las células fueron sometidas a tratamiento con paclitaxel a dosis terapéuticas. Las placas fueron despegadas y contadas a las 8, 24, 48 y 72h mediante el ensayo de la sulfordamina B. Los valores representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

Algo similar fue observado en las experiencias realizadas con la línea de carcinoma gástrico (GAS). La exposición de esta línea al paclitaxel durante las primeras 8 y 24 h no provoca alteraciones significativas en su capacidad de replicación (Figura 2). El análisis de los efectos provocados a los 2 días reveló una baja pero significativa inhibición de la proliferación que se situó en un 15.7%. Tan sólo cuando la exposición a la droga se mantuvo hasta las 72 h pudimos observar un gran incremento en la inhibición del crecimiento. En este caso, y a diferencia de lo encontrado en la línea SEM, el efecto del paclitaxel provocó una intensa reducción en la tasa de proliferación celular que llegó a alcanzar el 65.5%. Esta intensa modificación en los efectos del fármaco en función del tiempo de exposición no se produjo en ninguna de las líneas analizada anteriormente aunque en algunas, como las de pulmón, se superara ampliamente el 50% de inhibición y en otras, como es la línea SEM, se alcanzara, como ya se ha comentado, tan sólo un 37.5%.

Por último, el análisis de los efectos del paclitaxel sobre la línea derivada de cáncer de mama MCF-7, demostró una actividad intermedia entre los grupos de líneas analizados previamente. Así, se pudo determinar una significativa inhibición del crecimiento con este agente a concentraciones plasmáticas y con tiempos de exposición de 24 y 48 h. Dicha inhibición se situó en un 20.3% y un 49.4% respectivamente. La máxima inhibición se produjo a las 72 h, tiempo de exposición en el que se encontraron porcentajes de inhibición algo menores que los encontrados en A-549 y A-427. En este caso MCF-7 presentó una inhibición de un 65.5%.

### **3. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS DERIVADAS DE CÁNCER DE PULMON CÉLULAS NO PEQUEÑAS POR LA ACCIÓN DEL CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS**

Para determinar el efecto de inhibición de la proliferación tumoral de concentraciones plasmáticas de carboplatino, se realizó una experiencia equivalente a la descrita previamente.



**Figura 3.** Efecto del tratamiento con carboplatino sobre la proliferación de líneas tumorales de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Un número de  $30 \times 10^3$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 3 días. Las células fueron sometidas a tratamiento con paclitaxel. Las placas fueron despegadas y contadas a las 8, 24, 48 y 72 mediante el ensayo de la sulforodamina B. Los valores representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

En general, la aplicación de concentraciones similares a las plasmáticas así como una concentración superior e inferior, provocaron una importante reducción en la proliferación aunque siempre inferior a la descrita con paclitaxel tanto en las líneas de cáncer de pulmón como en las no pulmonares. La inhibición de la proliferación fue tiempo-dependiente, aunque las máximas inhibiciones se obtuvieron con tiempos más prolongados que los usados en paclitaxel y por último, como en el caso de paclitaxel, el efecto fue siempre más pronunciado en las líneas derivadas de CPCNP que en las derivadas de otros tejidos.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en relación a la inhibición que el carboplatino provoca en las líneas de cáncer de pulmón. Como se puede observar el carboplatino induce efectos parecidos en A-549, A-427 y en la línea NODO a concentraciones plasmáticas. En las tres líneas se observa una inhibición de la proliferación que se detecta de forma significativa a las 24 h. Así, a este tiempo de exposición, la inhibición de la proliferación fue de un 18.5%, un 23.1%, 22.7% en las líneas A-549, A-427 y NODO, respectivamente. Concentraciones superiores e inferiores de fármaco consiguieron modificar sólo ligeramente el porcentaje de inhibición de la proliferación. Sin embargo y a diferencia de lo observado en las experiencias realizadas con paclitaxel, no hubo un incremento significativo cuando dicho tiempo de exposición se prolongó hasta las 48 h (24,5%, 24,8% y 17.7%, para A-549, A-427 y NODO, respectivamente) o a las 72h (23.7% y 22,5% para A-549 y A-427, respectivamente). Sólo los estudios realizados en la línea NODO a las 72 h demostraron una inhibición de un 30.9% que resultó ser significativa en relación a la encontrada a las 48 h.

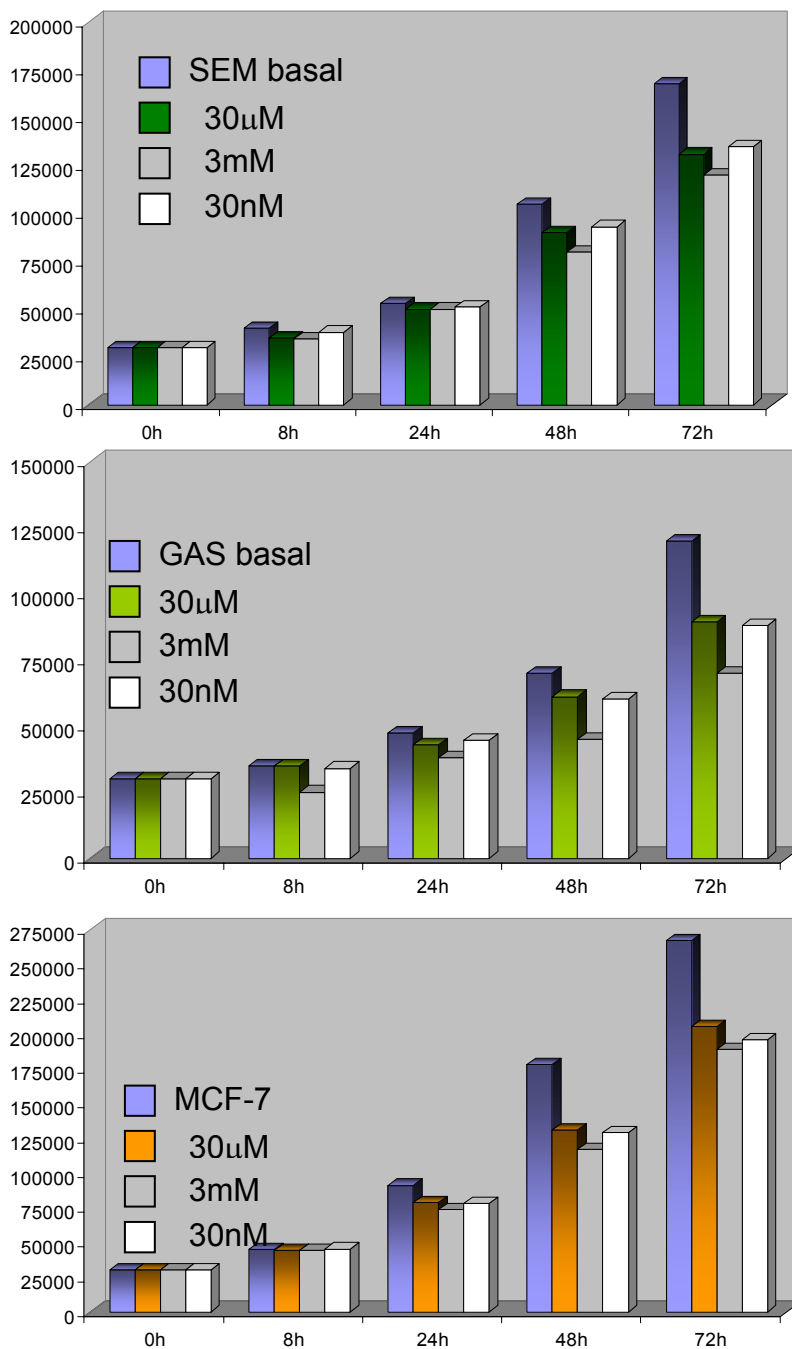
#### **4. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS DERIVADAS DE OTROS TUMORES POR LA ACCIÓN DEL CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES TERAPÉUTICAS**

Siguiendo el mismo esquema experimental que con paclitaxel, concentraciones plasmáticas de carboplatino fueron testadas sobre células tumorales no derivadas de cáncer de pulmón. La Figura 4 resume los

resultados obtenidos. Las células de seminoma fueron menos sensibles al carboplatino que las derivadas de cáncer de pulmón. La exposición de estas células al fármaco a concentraciones plasmáticas no consiguió alcanzar una inhibición del 50% ni siquiera en el tiempo de exposición mayor (72 h). Dicha inhibición fue tan sólo de un 22.02%. Por otra parte, concentraciones mayores y menores no consiguieron modificar de forma significativa los porcentajes de inhibición. Tan sólo, la exposición de dosis mayores durante 72 h aumentaron la inhibición a tasas cercanas al 30% (28.5%). Los análisis realizados en tiempos de exposición más cortos, fundamentalmente a 8 y 24h, demostraron la no existencia de modulación en la proliferación celular tal y como se puede apreciar en la gráfica (Figura 4).

Por otra parte, el carboplatino sobre la línea GAS se comportó de una forma similar. La mayor actividad de fármaco a concentraciones plasmáticas se situó a las 72 h de exposición (22.02% de inhibición) mientras que con exposiciones más cortas sólo un 14.2% (48 h) y un 5.6% (24 horas) de descenso en la proliferación celular pudo ser observado. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en la línea SEM, el aumento en las concentraciones de carboplatino (dosis alta) si consiguió provocar un aumento significativo de la inhibición de la proliferación que fue de un 39% a las 72 h, lo que indica un efecto dosis dependiente para los tiempos de exposición indicados. Dosis menores de carboplatino no modificaron la inhibición de la proliferación.

Finalmente, la acción del carboplatino sobre la línea MCF-7, de forma similar a lo que ocurrió con el paclitaxel, demostró una actividad intermedia entre los grupos de líneas analizados previamente. El carboplatino a concentraciones plasmáticas indujo una significativa inhibición del crecimiento a tiempos de exposición de 24 h (13.4%), inhibición que se situó en un 26.4% y un 39.4% a las 48 h y 72 h respectivamente.



**Figura 4.** Efecto del tratamiento con paclitaxel sobre la proliferación de líneas derivadas otros tumores: seminoma (línea SEM), cáncer gástrico (GAS) y cáncer de mama (MCF-7). Un número de  $30 \times 10^3$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 3 días. Las células fueron sometidas a tratamiento con paclitaxel a dosis terapéuticas. Las placas fueron despegadas y contadas a las 8, 24, 48 y 72h mediante el ensayo de la sulforodamina B. Los valores representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

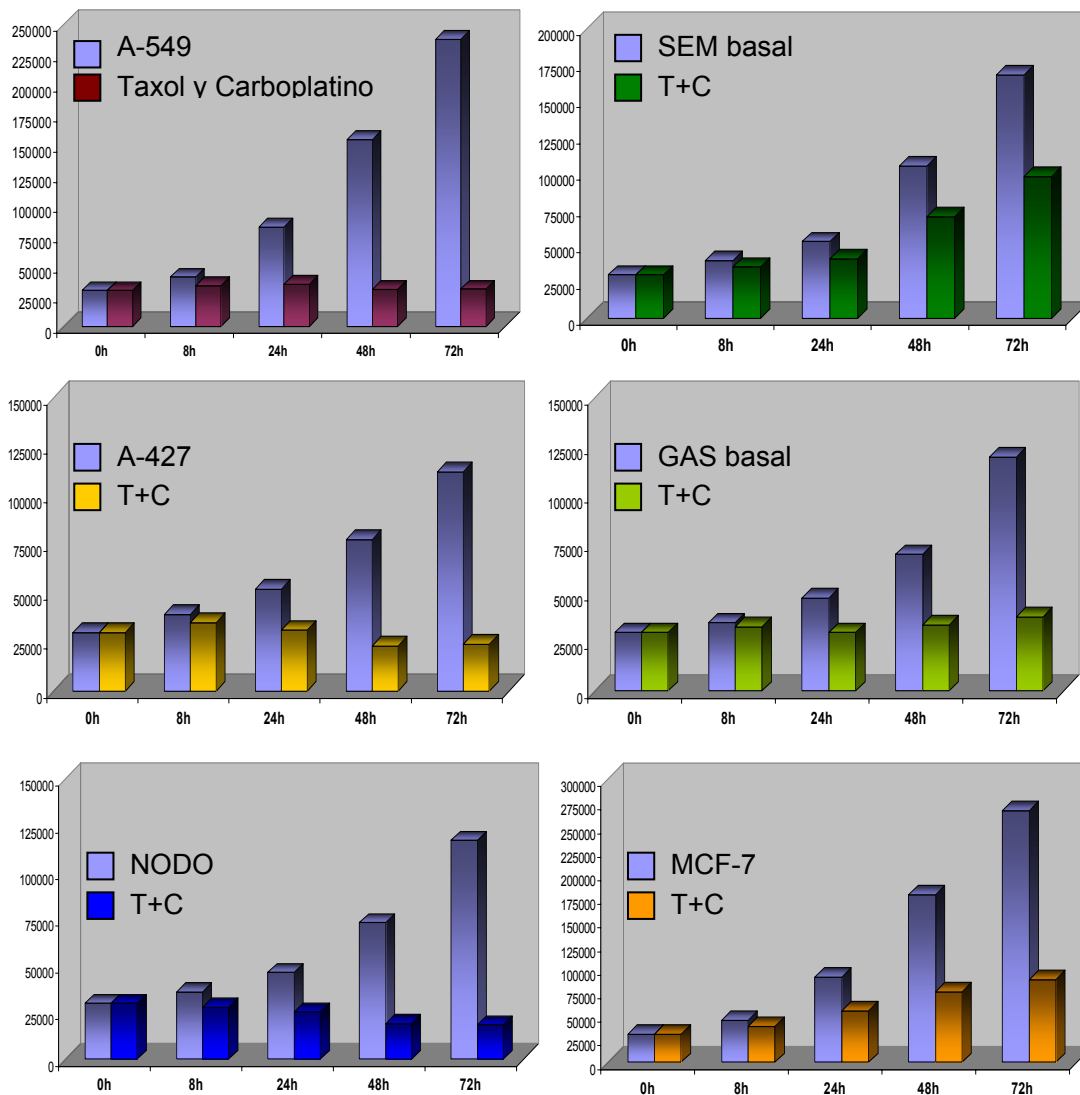
## **5. COMBINACIÓN DE PACLITAXEL Y CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS: EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS TUMORALES.**

En base a los resultados obtenidos previamente y a que la asociación de paclitaxel y carboplatino es de uso habitual en clínica para el tratamiento del CPCNP, se realizó una experiencia basada en la exposición de las líneas testadas previamente a la asociación de ambos fármacos. A pesar de las modificaciones detectadas en la acción de paclitaxel y carboplatino según su concentración, la experiencia sólo fue llevada a cabo con las concentraciones plasmáticas de ambos. La Figura 5, muestra que la combinación de ambos fármacos provoca un aumento en la inhibición de la proliferación en relación a la utilización de los fármacos utilizados de forma individual. No obstante, tal y como se puede observar analizando la figura 5, no existe un efecto sumatorio, probablemente porque a las concentraciones utilizadas se alcanza un efecto meseta, por saturación de los mecanismos de muerte celular inducida por los fármacos.

## **6. COMBINACIÓN DE PACLITAXEL Y CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS: EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS LÍNEAS TUMORALES.**

Para realizar el estudio morfológico de las células expuestas al tratamiento farmacológico, se seleccionaron sólo las concentraciones plasmáticas y por tanto terapéuticas de ambos agentes y se realizaron cultivos sólo con la asociación de ambos fármacos. Los objetivos de este estudio fueron, en primer lugar, determinar los cambios en la morfología celular de las células tumorales bajo la presencia de ambos fármacos, en segundo lugar, determinar si el patrón de cambios es similar en todas ellas y en tercer lugar, determinar la presencia de células con o sin cambios de la morfología celular que mantenga su replicación en presencia del tratamiento y que formen núcleos de proliferación.



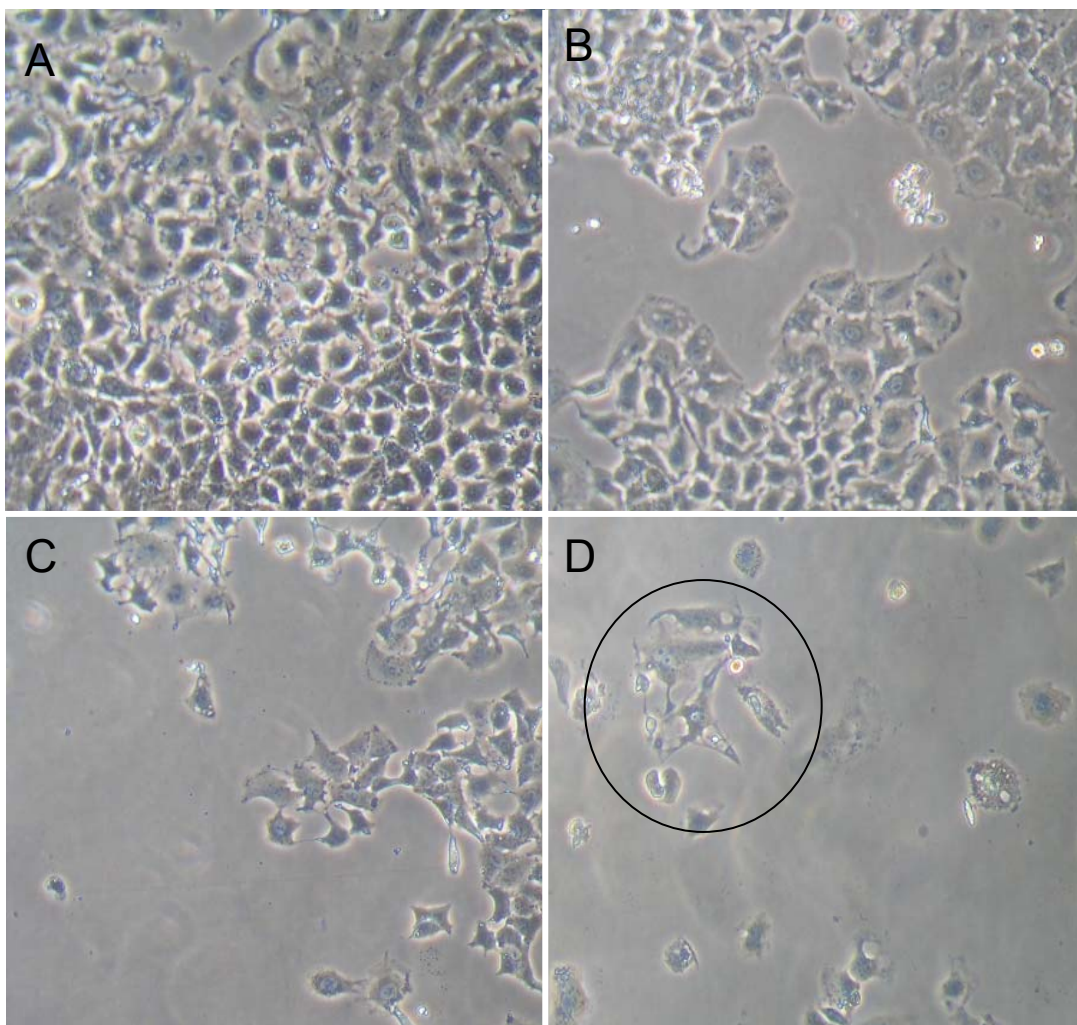


**Figura 5.** Análisis del efecto de la asociación de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas en líneas tumorales derivadas de CPCNP (A-549, A-427, NODO) y líneas derivadas de seminoma (línea SEM), carcinoma gástrico (GAS) y cáncer de mama (MCF-7). Un número de  $30 \times 10^3$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 3 días. Las células fueron sometidas al tratamiento indicado. Las placas fueron despegadas y contadas a las 8, 24, 48 y 72h mediante el ensayo de la sulforodamina B. Los valores representan la media + S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

## **Líneas derivadas de CPCNP**

La línea A-549 se caracterizó por poseer un tiempo de replicación de 16 h y por presentar una típica morfología de carácter aplanada y perímetro poligonal. Su crecimiento se produce en monocopa, de forma regular y con evidentes zonas de contacto intercelular (Figura 6A). Un hallazgo típico de este tipo celular fue la presencia de una cierta irregularidad en la membrana, irregularidad que fue originada por la presencia de una gran cantidad de microvellosidades agrupadas y sólo observables mediante el análisis de microscopio de barrido o transmisión (datos no mostrados).

El análisis de la morfología celular en presencia de paclitaxel y carboplatino en el medio de cultivo fue realizado a diferentes tiempos. Tras 24 h de exposición (Figura 6B) se produjo una clara disminución en la densidad celular apareciendo zonas en las que se perdió la monocopa y el contacto intercelular. En algunas ocasiones se pudieron observar “islas” de células que habían perdido el contacto con el resto del cultivo celular y que finalmente, en el seguimiento que se les hizo mediante microscopía, terminaron por morir. Como se puede apreciar en la Figura 6C, el tratamiento con paclitaxel y carboplatino indujo a las 48 horas una intensa inhibición de la proliferación que se tradujo en un aumento de territorio de cultivo ocupado por “calvas celulares”. En este tiempo de tratamiento destacó la presencia de un incremento en las irregularidades de la membrana celular más pronunciadas que las observadas en los cultivos parentales. Fueron las células aisladas las que mostraron predominantemente estas irregularidades (Figura 6C). Estas células no formaron núcleos, alcanzaron un aspecto muy irregular y finalmente murieron. En los cultivos analizados a las 72 h de tratamiento aparecieron numerosas células con un carácter redondeado, la mayoría fijadas aún al frasco de cultivo o en algunas ocasiones despegadas de él. Estas células finalmente mostraron grandes irregularidades en la membrana que terminó por fragmentarse conduciendo a la muerte celular.

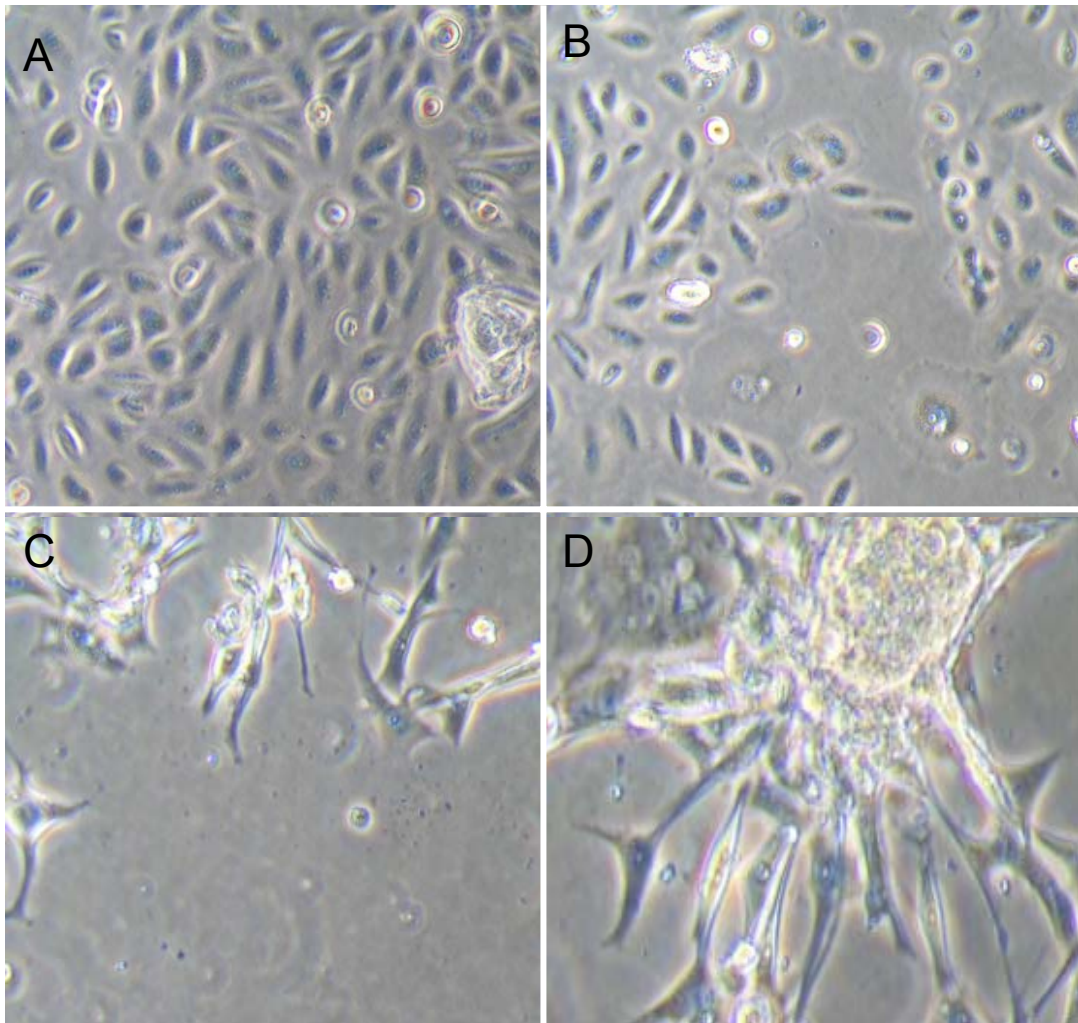


**Figura 6.** Morfología de la línea de cáncer de pulmón A-549 en cultivo en presencia de tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas. Se muestra la evolución del cultivo con 24 (B, x20), 48 (C, x20) y 72 h (D, x20) de tratamiento en relación al cultivo control (A, x20). La imagen señalada con un círculo indica la generación de un núcleo de células no afectadas por el tratamiento. Dichas células crecieron en monocapa tanto en cultivos sometidos a la presión farmacológica como en los que se retiraron los agentes.

Sin embargo, el hecho más significativo en los cultivos a las 72 h fue la presencia de pequeños núcleos de células (en muchos casos tan sólo dos o tres células) que, manteniendo una morfología prácticamente normal y sin presentar irregularidades en la membrana, permanecieron aislados del resto del cultivo celular (Figura 6D) . El seguimiento de estos núcleos tras la 72 h de tratamiento demostró que tanto sin fármaco como con la presencia del mismo,

las células se fueron replicando prácticamente con un tiempo de duplicación estándar y tuvieron la capacidad de formar de nuevo una monocapa. Estos núcleos sugieren de una forma clara la presencia de células “resistentes” a los agentes farmacológicos que son capaces de crecer en su presencia.

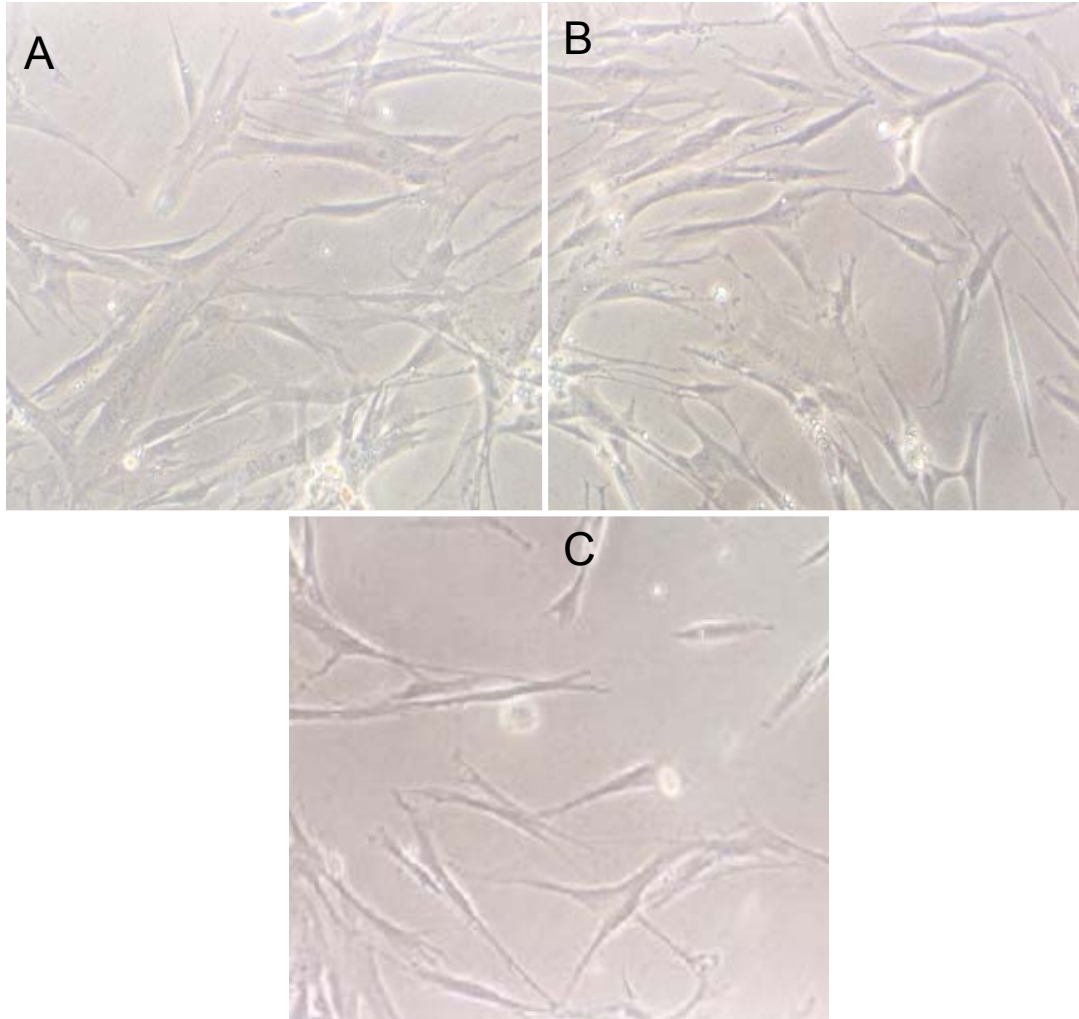
El estudio morfológico de la línea A-427 dió lugar a resultados similares aunque presentó algunas particularidades. A diferencia de la línea A-549, las células A-427 parentales (Figura 7A) mostraron una morfología ovoidea y en algunos casos triangular aunque, como A-549, presentó un crecimiento en monocapa con una tasa de replicación similar. Las células, ligeramente mayores que las de A-549, presentaron membranas completamente lisas en las que no se pudo apreciar irregularidades debido a la baja tasa de microvellosidades. Su crecimiento fue regular ocupando toda la superficie del frasco de cultivo hasta presentar contactos intercelulares entre ellas. La morfología de estas células se mantuvo casi intacta con el tratamiento de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas durante las primeras 24 h. Como se puede observar en la Figura 7B, sólo la presencia de “calvas celulares” permitió distinguir estos cultivos de los parentales ya que las células siguieron siendo ovoideas o triangulares. Sin embargo, el mantenimiento de los cultivos con presencia de fármacos hasta las 48 h provocó un drástico cambio en la morfología acompañado de una intensa reducción en la densidad celular. Tal y como se parecía en la Figura 7C, las células A-427 aparecieron espiculadas, alargadas e incluso en algunos casos estrelladas perdiendo los contactos entre ellas y apareciendo con parte del “cuerpo celular” despegado del frasco de cultivo. El seguimiento de estas células mediante el microscopio óptico demostró que estas células terminaron por morir. No obstante, a diferencia de A-549 no pudimos apreciar alteraciones de la membrana celular hasta tiempos de exposición superiores. Sin embargo, y al igual que ocurría en A-549, algunas de estas células de morfología espiculada formaron núcleos de proliferación (Figura 7D). El seguimiento de estos núcleos demostró que eran células no afectadas por la presencia de fármacos, lo que sugería que eran “resistentes” a su efecto ya que presentaban una tasa de replicación parecida a las de las células parentales.



**Figura 7.** Morfología de la línea de cáncer de pulmón A-427 en cultivo en presencia de tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas. Se muestra la evolución del cultivo con 24h (B, x20) y 48h (C, x20) de tratamiento en relación al cultivo control (A, x20). A las 72 h (D, x40) se pudieron observar núcleos de células expandidos y que siguieron creciendo en presencia de los agentes farmacológicos.

Por último, se realizó un estudio de la línea derivada de metástasis de CPCNP. Esta línea se caracterizó por presentar un crecimiento mucho más lento que las anteriores situándose su tasa de replicación en 28 h. Desde el punto de vista morfológico tuvo un crecimiento en monocapa sin formar nunca núcleos de proliferación. Su morfología fue típicamente alargada remedando miofibras que en algunos casos presentaron zonas de contacto, aunque la

mayoría permanecieron aisladas (Figura 8A). Su aspecto fue aplanado con una expansión regular del cuerpo celular sobre el frasco de cultivo.



**Figura 8.** Morfología de la línea metastásica de cáncer de pulmón NODO en cultivo en presencia de tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas. Se muestra la evolución del cultivo con 48 h (B, x20) y 72 h (C, x20) de tratamiento en relación al cultivo control (A, x20).

A diferencia de lo encontrado en las otras dos líneas de cáncer de pulmón, el tratamiento con paclitaxel y carboplatino no produjo una alteración morfológica notable a las 24 (datos no mostrados) ni a las 48 h (Figura 8B), ni afectó de forma visible en estos periodos, al menos desde el estudio con microscopía, a la regularidad de la membrana celular. Además, en los estudios a los diferentes tiempos no aparecieron “calvas celulares” como en los casos

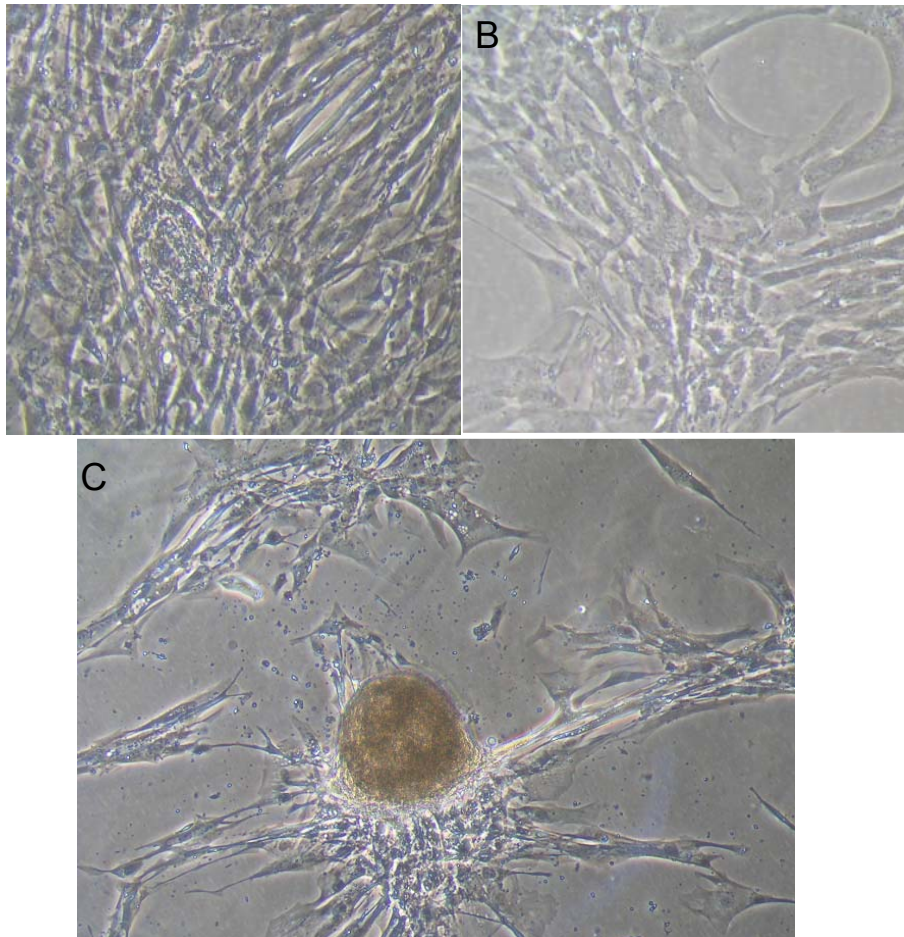
anteriores, aunque si se pudo observar a las 72 h una significativa disminución de la densidad celular. En las imágenes obtenidas a este tiempo de exposición (72 h) (Figura 8C) no pudimos observar la formación de núcleos celulares de proliferación aunque algunas células permanecieron en el cultivo y no presentaron signos de muerte celular. Estas células, en el seguimiento del cultivo, tuvieron capacidad de replicarse en presencia de los agentes farmacológicos (paclitaxel y carboplatino) aunque con una tasa de replicación bastante inferior a la mostrada por las células parentales.

### **Líneas derivadas de otros tumores**

La primera línea testada en crecimiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas no procedente de cáncer de pulmón fue la línea de seminoma denominada SEM. Los cultivos parentales de esta línea mostraron una morfología de carácter alargado, en algunos casos espiculada, con un crecimiento en monocapa en donde predomina el crecimiento de carácter nuclear con conjuntos de células que mantienen un estrecho contacto intercelular hasta llegar a ocupar progresivamente toda la superficie de cultivo. La Figura 9A muestra un cultivo típico de células parentales en el que una vez ocupada toda la superficie del frasco aparecen entrelazadas en forma de “red” aunque sin perder su morfología inicial.

Las células SEM sometidas al tratamiento con paclitaxel y carboplatino no mostraron un cambio en la morfología propiamente dicho sino más bien una reducción en la densidad que se mostró en primer lugar en los núcleos celulares tal y como muestra la Figura 9B. Estos cambios se pudieron observar tanto a las 24, a las 48 y a las 72 h aunque, a diferencia de lo que ocurrió en los cultivos de células derivadas de cáncer de pulmón, la densidad celular se mantuvo elevada, lo que habla de un menor efecto de estos agentes en este tipo tumoral. Por último, y tal y como muestra la Figura 9C, cultivos con 72 h de exposición (y en algunos casos a los de 48h) se pudo apreciar como grupos de células que formaron núcleos celulares, comenzaron a replicarse. En este caso los núcleos tuvieron más una tipología de “grumos celulares” en los que las células no se encontraban en monocapa. Sin embargo, su expansión, que se observó en la parte periférica, fue de células que si se distribuyeron en

monocapa. Estos núcleos estaban formados por células que crecían en presencia de la presión de los agentes farmacológicos y que por tanto posiblemente presentaban “resistencia” a los mismos.



**Figura 9.** Morfología de la línea de seminoma SEM en cultivo en presencia de tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas. Se muestra la evolución del cultivo con 48 h (B, x20) y 72 h (C, x20) de tratamiento en relación al cultivo control (A, x20). La imagen C presenta la constitución de un núcleo de proliferación. Este núcleo comenzó a expandirse periféricamente a pesar de la presencia de la presión farmacológica a la que estaba sometido.

Desde un punto de vista morfológico la línea derivada de cáncer gástrico (GAS) se comportó de una forma muy similar a la de seminoma. Las células parentales presentaron un aspecto alargado con disposición en paralelo



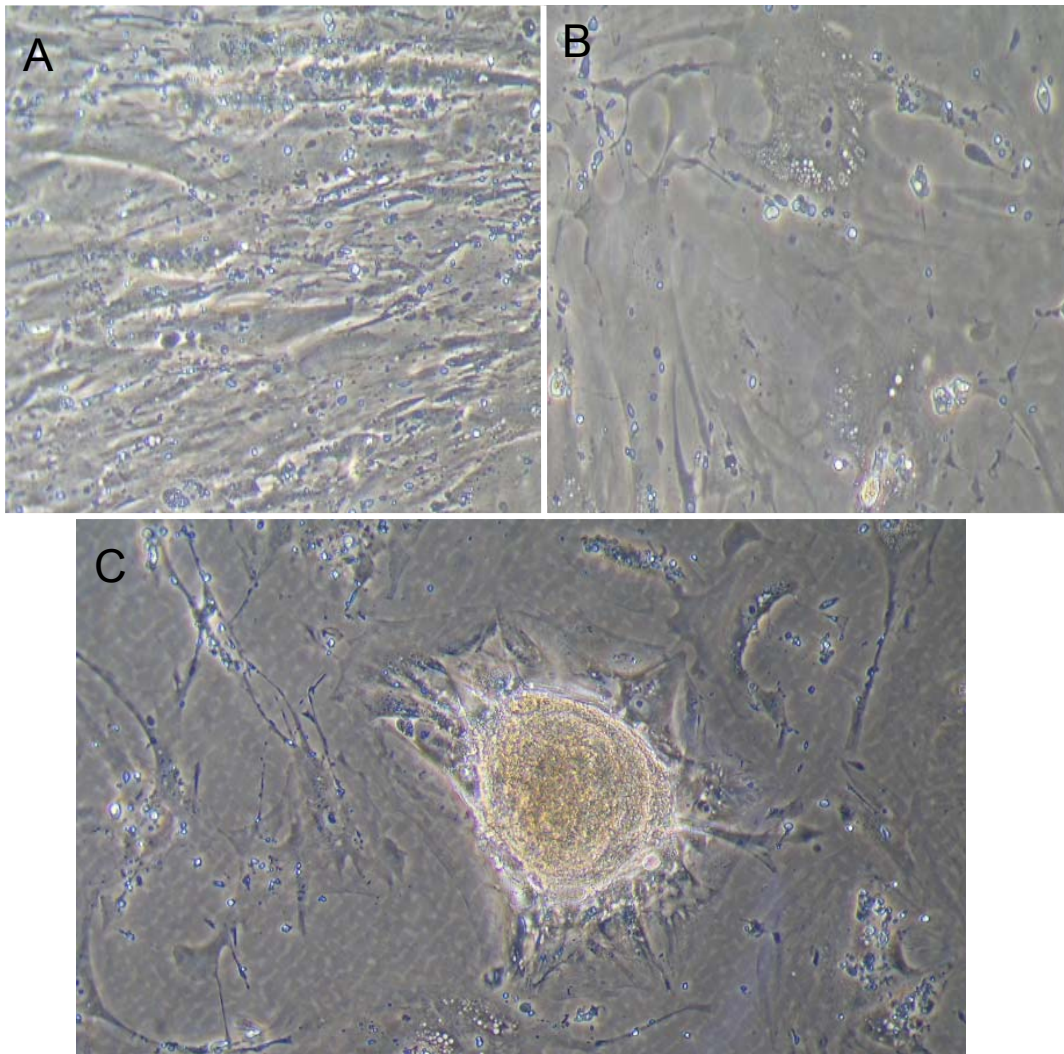
remedando las fibras musculares y creciendo en monocapa sin formar núcleos (Figura 10A).

La exposición al tratamiento combinado indujo una disminución de la densidad celular que fue patente a partir de las 48 h (Figura 10B). Las células se aplanaron y se extendieron sobre la superficie del frasco de cultivo. Por último, a las 72 h (y también a las 48 h) fue visible la presencia de núcleos de células que posteriormente crecieron en medio con agentes citotóxicos y que fueron similares a las observadas en la línea SEM.

Por último, los estudios realizados en la línea de cáncer de mama MCF-7 fueron en todo paralelos a los encontrados en la línea A-549. En ellas también se produjo una disminución significativa de la población en los cultivos aunque no tan marcada como en las líneas de cáncer de pulmón y también se pudieron detectar núcleos de crecimiento después de 72 h de tratamiento.

## **7. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PACLITAXEL Y CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS.**

Para determinar la importancia del efecto apoptótico como mecanismo de acción de la asociación de concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino, se realizó un estudio mediante marcaje de anexina-IP. Este estudio se limitó sólo a las células derivadas de cáncer de pulmón. En general y como se observa en la Figura 11, ambos fármaco indujeron apoptosis en todas las líneas testadas siendo en general la apoptosis inducida por carboplatino ligeramente mayor que la de paclitaxel. La adición de ambas drogas produjo un notable incremento de la tasa de apoptosis en los tiempos en que se mantuvo la exposición.



**Figura 10.** Morfología de la línea de cáncer gástrico GAS en cultivo en presencia de tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas. Se muestra la evolución del cultivo con 48 h (B, x20) y 72 h (C, x20) de tratamiento en relación al cultivo control (A, x20). La imagen C presenta la constitución de un núcleo de proliferación. Este núcleo comenzó a expandirse periféricamente a pesar de la presión farmacológica a la que estaba sometido.

Así, en la línea A-549 (Figura 11A) el paclitaxel indujo un porcentaje de apoptosis que varió desde un 31,11% a un 51,38% entre las 8 y las 72 h de exposición (los valores intermedios de apoptosis fueron de un 44,47 y un 53,38% a las 24 y 48 h, respectivamente). Por otra parte, el carboplatino originó valores de apoptosis ligeramente mayores que el paclitaxel en las primeras horas de tratamiento 42,79% y 43,75% a las 8 y 24 h respectivamente. No

obstante, en exposiciones más prolongadas dichos valores fueron ligeramente inferiores a los del paclitaxel (39,11% y finalmente un 44,3% a las 48 y 72 h respectivamente). El estudio utilizando ambos agentes a la vez, demostró un mayor porcentaje de apoptosis pero determinó la no existencia de un efecto sumatorio entre ambos fármacos. Así, dichos porcentajes de apoptosis oscilaron entre un 60,27 y un 66,78% a lo largo del proceso de inducción.

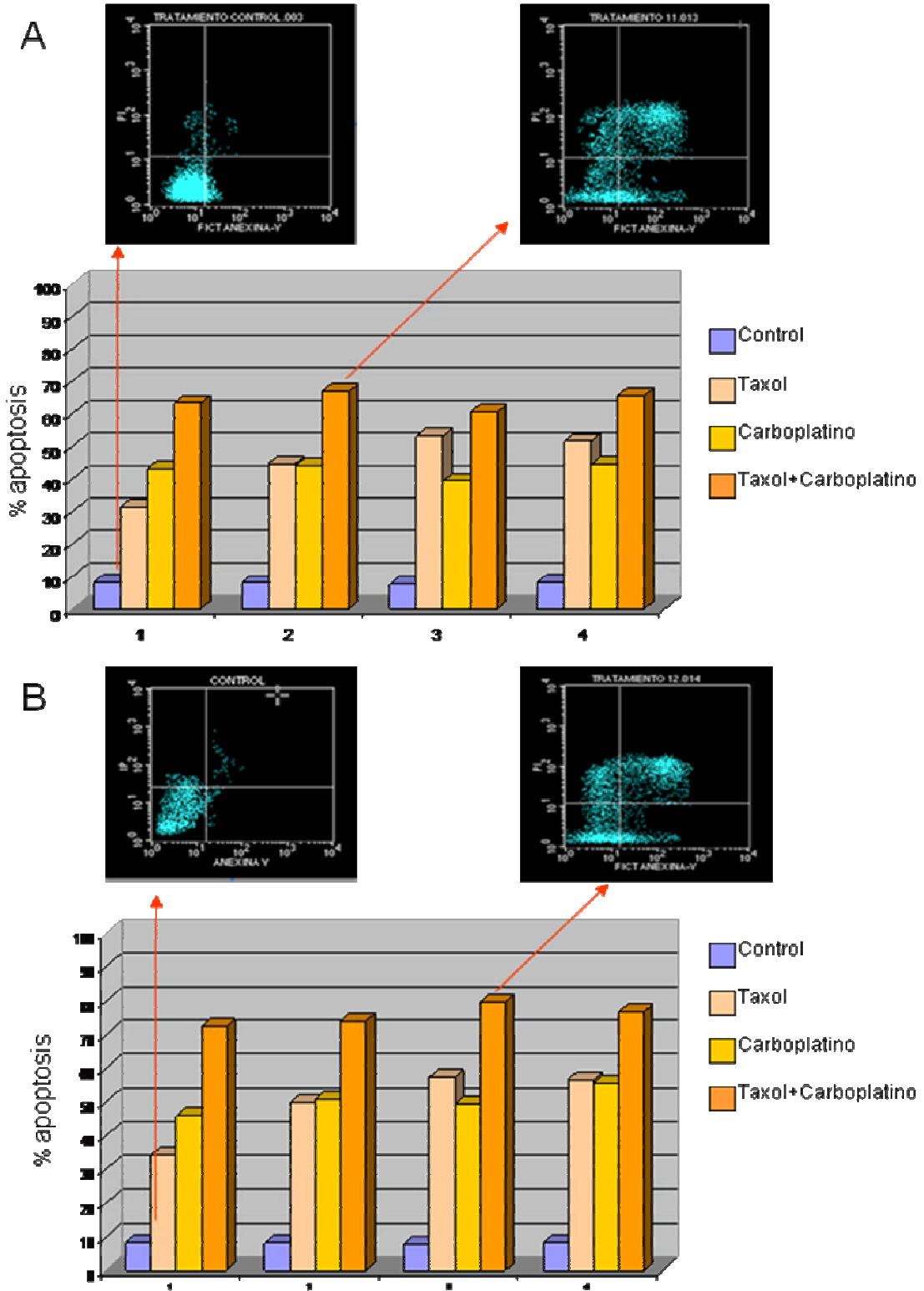
Por otra parte, en la línea A-427 (Figura 11B) el paclitaxel indujo un porcentaje de apoptosis que fue ligeramente mayor a los obtenidos en A-549; 34,1, 49,4, 57,8 y 56,6% en los tiempos ya referidos (8 h, 24 h, 48 h y 72 h). El carboplatino también tuvo un efecto ligeramente mayor sobre esta línea, encontrándose unos niveles de apoptosis en un rango entre un 45,7% a las 8h y un 55,3% a las 72 h. La asociación de ambos fármacos todavía tuvo la capacidad de aumentar el rango de apoptosis hasta niveles de un 76,6% a las 72 h en esta línea.

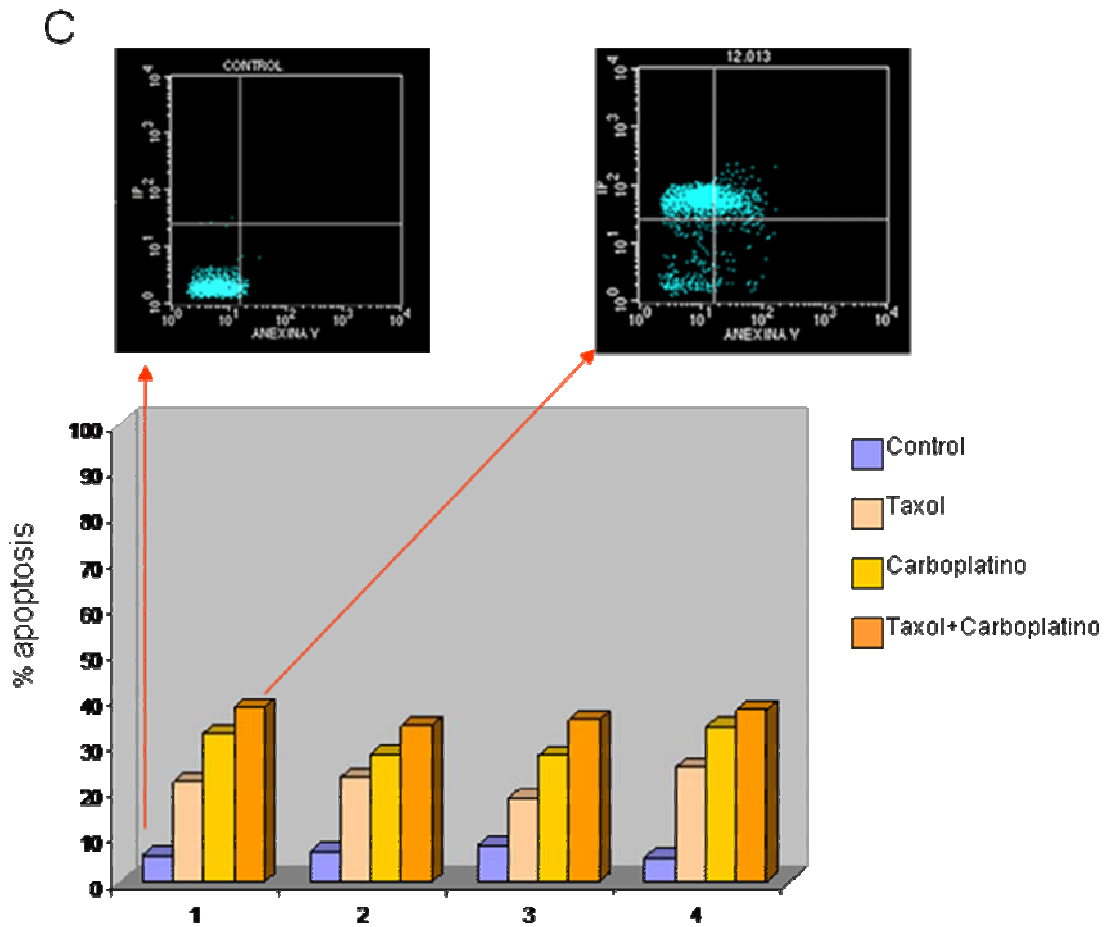
Cuando el análisis se realizó en la línea NODO, los resultados fueron significativamente distintos. En general pudimos observar que la capacidad de inducir apoptosis por ambos fármacos fue menor, al igual que su efecto de asociación. Así, paclitaxel a concentraciones plasmáticas indujo un 22, 22,9, 18,3 y un 25% de apoptosis a las 8, 24, 48, 72 h respectivamente (Figura 11C). Carboplatino, como en el caso anterior, tuvo un mayor efecto detectándose niveles de apoptosis de un 32,5, 28, 27,7 y 33,9% en los mismos tiempos de exposición. Finalmente, la asociación de ambos consiguió aumentar ligeramente este porcentaje que se situó entre un 34,4 y un 38,2% a lo largo de la exposición.

## **8. VALORACIÓN MICROSCÓPICA DEL FENÓMENO DE APOPTOSIS INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS.**

Una vez determinado mediante los análisis de FACScan que la morfología previamente observada al microscopio óptico era debida a un proceso apoptótico inducido por las concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino, realizamos un segundo estudio para confirmar este fenómeno.

La técnica elegida fue la visualización mediante microscopio de fluorescencia de la especial tinción que produce la anexina/ioduro de propidio en estas células.

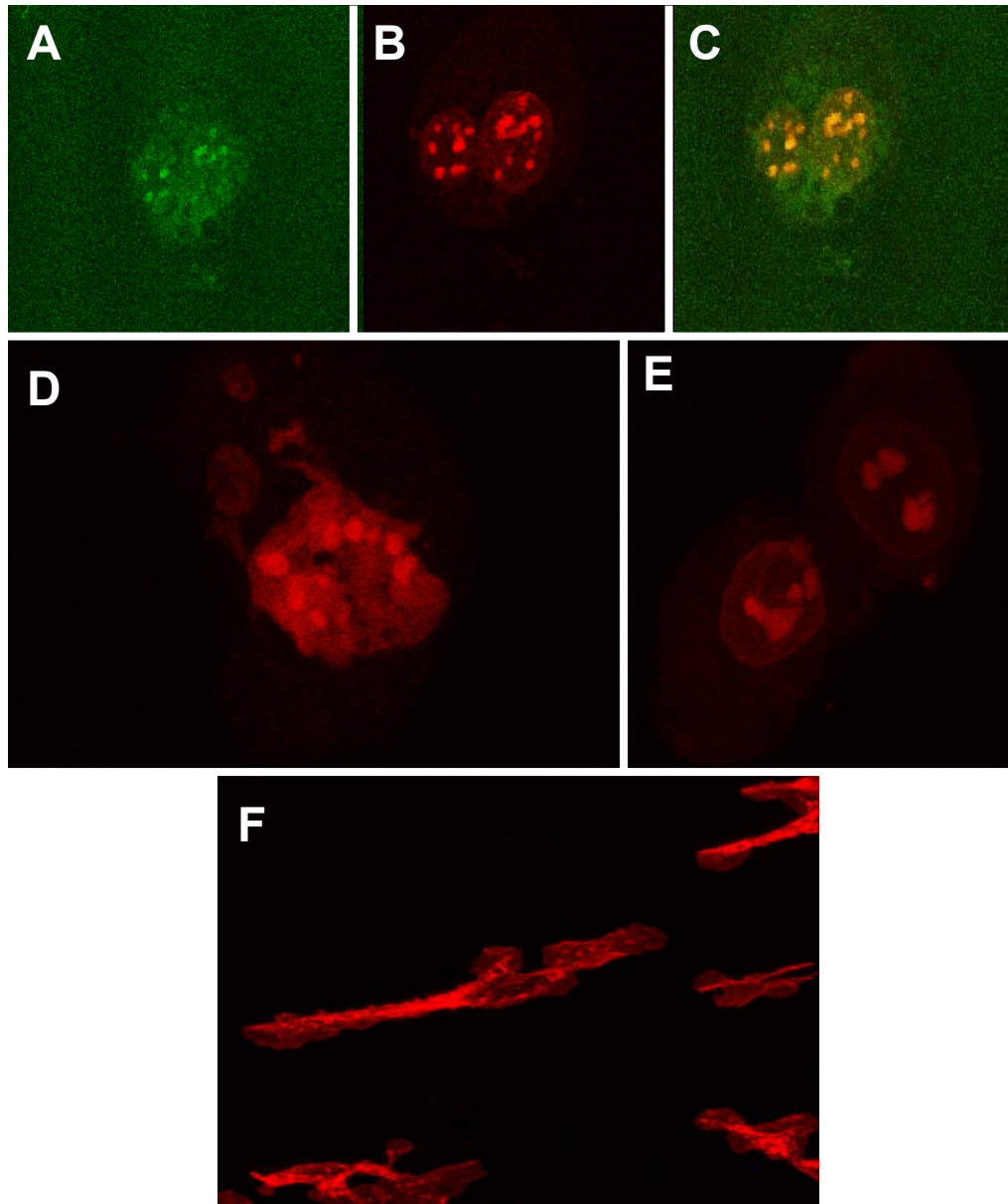




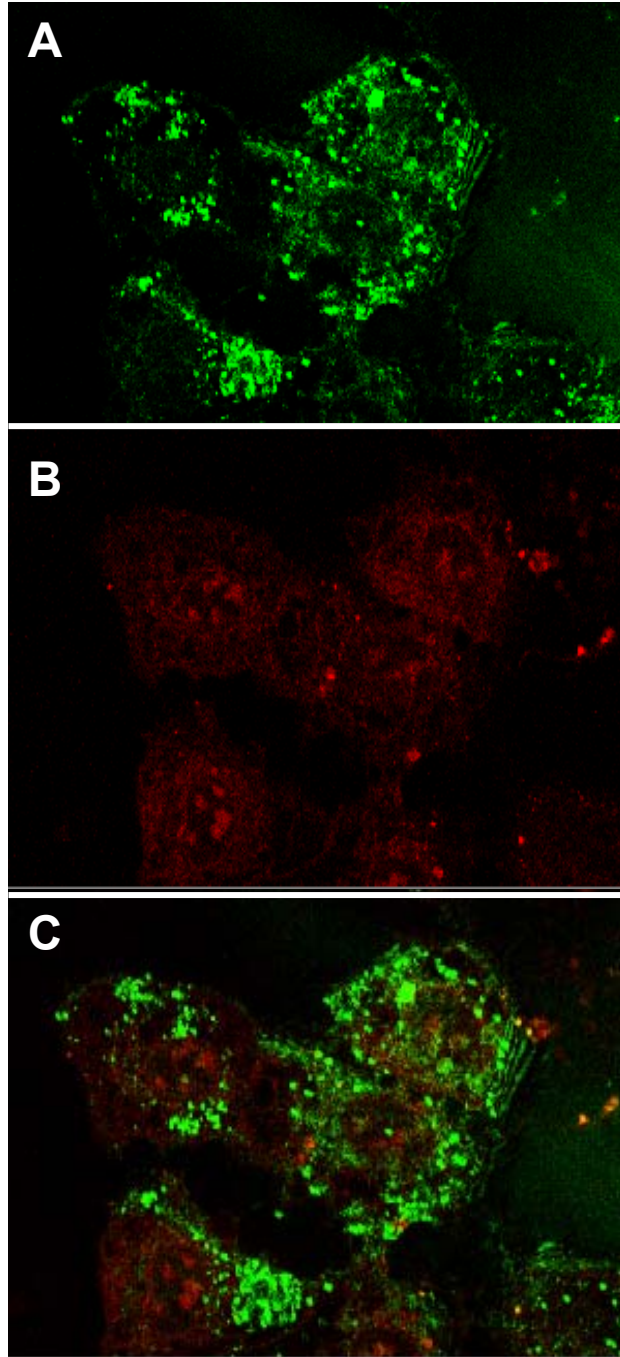
**Figura 11.** Estudio mediante anexina e ioduro de propidio de la modificaciones producidas en los niveles de apoptosis inducidos por los agentes paclitaxel y carboplatino a dosis citoplasmáticas en las líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas A-549 (A), A-427 (B) y NODO (C). Los resultados son expresados en % de apoptosis del estudio realizado mediante FACScan. Se muestran los FACScan de los resultados más significativos. El resultado es media de 4 experiencias independientes  $\pm$  SD.

Como se puede observar en la Figura 12, paclitaxel a concentraciones plasmáticas induce una clara apoptosis en la línea A-549 que aparecen positivas para el marcaje de membrana y posteriormente, la permeabilización de esta membrana, permite el paso del IP que tiñe el núcleo. En las fases más avanzadas hay una auténtica necrosis en la que el IP difunde por toda la célula. El dato más relevante de esta experiencia fue la observación de un incremento notable de la tinción de anexina cuando el tratamiento combinó paclitaxel y

carboplatino lo que no sólo aumentó el porcentaje de apoptosis como vimos, sino la intensidad del mismo (Figura 13).

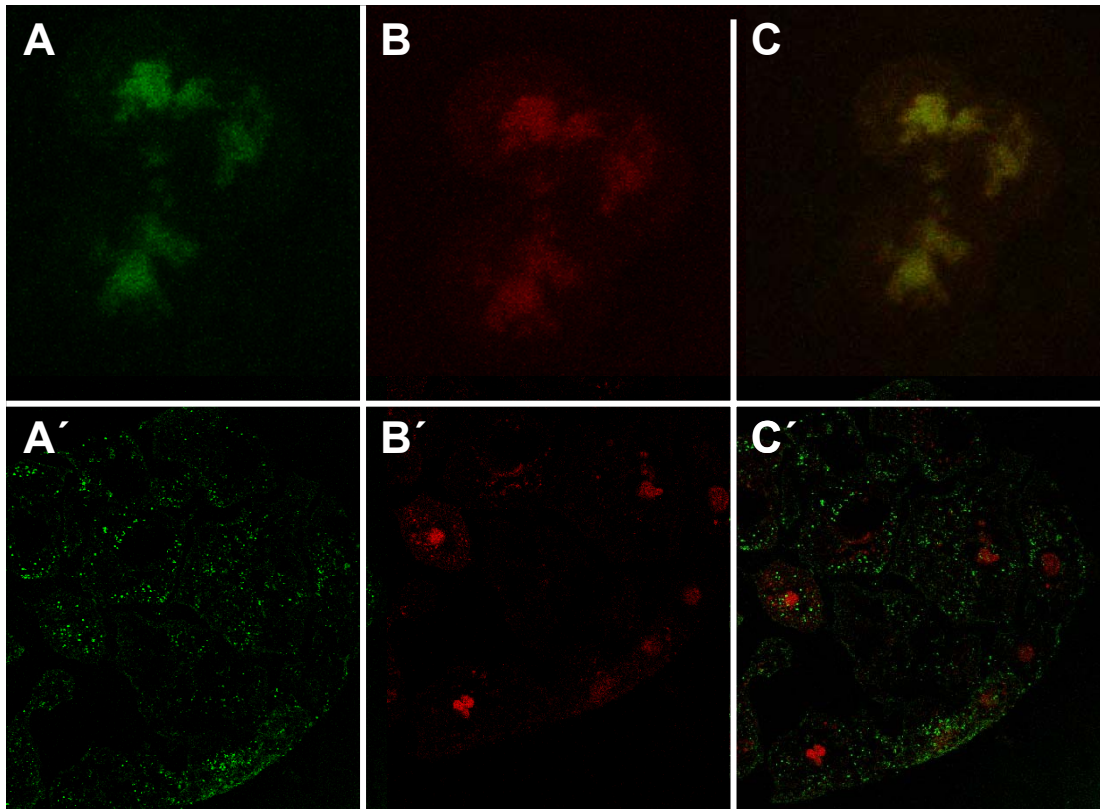


**Figura 12.** Demostración de la aparición de apoptosis tras el tratamiento con paclitaxel a concentraciones plasmáticas de la línea A-549. Se muestra la tinción de células tumorales mediante anexina (A), IP (B) y la combinación de ambas imágenes (C) después de un tratamiento durante 48 h con paclitaxel. El paclitaxel provoca posteriormente (72 h) la entrada de IP en el núcleo de algunas células de forma masiva (D) lo que las lleva a un estado de necrosis y muerte celular (E y F).



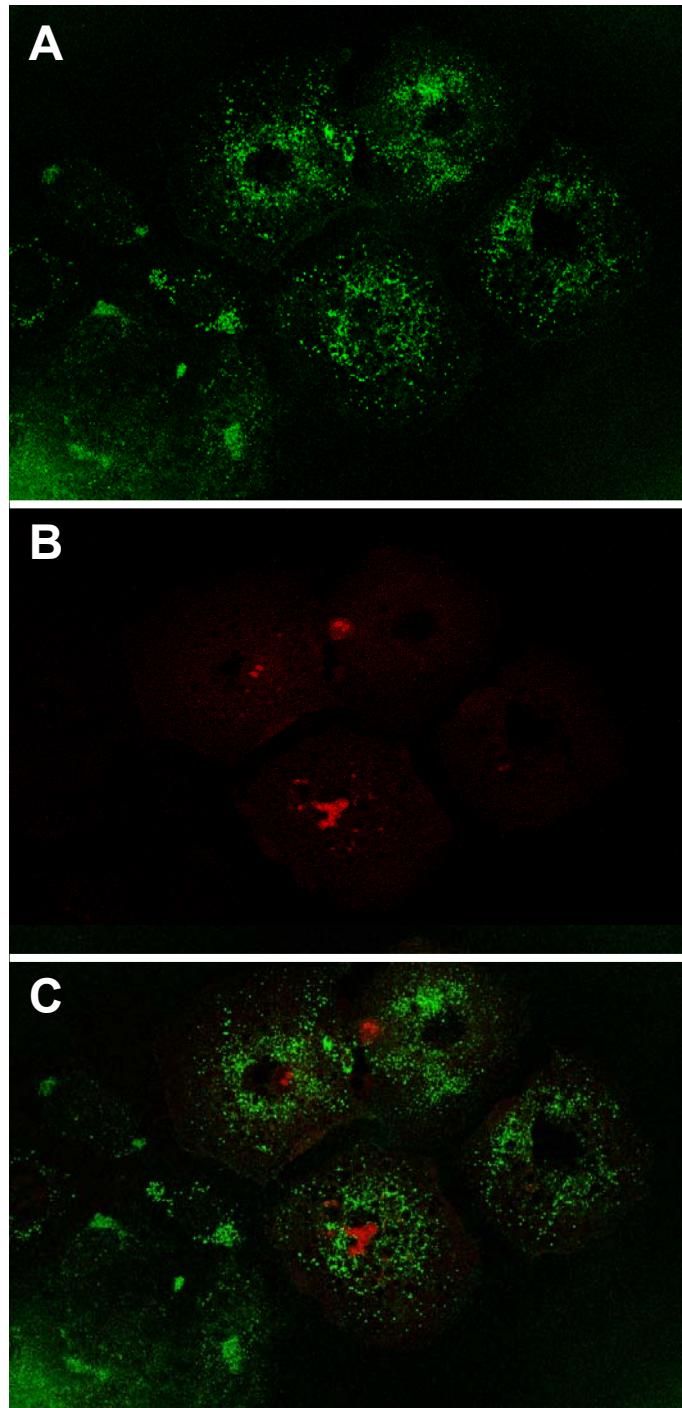
**Figura 13.** Apoptosis inducida tras el tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas en la línea A-549. Se muestra la tinción de células tumorales mediante anexina (A), IP (B) y la sumación de ambas imágenes (C) después de un tratamiento durante 48 h.

Datos muy similares fueron encontrados en A-427 (no mostrados). Por el contrario, la línea NODO al igual que el caso de GAS, mostró más resistencia al marcaje. Así los ensayos de esta línea con carboplatino permitieron visualizar un marcaje muy débil, especialmente de la membrana, que fue más aparente después de la 48 h (Figura 14). Como en el caso de A-549 la asociación de ambos fármacos aumentó la intensidad del marcaje apoptótico aunque nunca llegó a ser como el observado en las líneas procedentes de tumores primarios (Figura 15).



**Figura 14.** Demostración de la aparición de apoptosis tras el tratamiento con carboplatino a concentraciones plasmáticas de la línea NODO. La apoptosis inducida fue menos intensa. Se muestra la tinción de células tumorales mediante anexina (A y A'), IP (B y B') y la sumación de ambas imágenes (C y C') después de un tratamiento durante 48 h con carboplatino.





**Figura 15.** Incremento de la apoptosis tras el tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas de la línea NODO. La apoptosis inducida fue menos intensa. Se muestra la tinción de células tumorales mediante anexina (A), IP (B) y la sumación de ambas imágenes (C) después de un tratamiento durante 48 h con carboplatino.

## **9. PATRONES DE RESISTENCIA INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO DE PACLITAXEL Y CARBOPLATINO A CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS.**

Una vez observada la actividad de diferentes concentraciones de fármacos en relación a la inhibición de la proliferación y apoptosis celular de las células tumorales, se realizó un estudio de la modulación de la expresión de genes de resistencia. Para remedar las condiciones fisiológicas de los pacientes bajo tratamiento, las líneas se indujeron sólo con la concentración plasmática de fármaco, realizando el estudio a diferentes tiempos de exposición: 3h, 6h (tiempo de máxima concentración en humanos), 24 y 48 h (protocolo modificado de Oguri y cols., 2000; Yoshida y cols., 2001)

La valoración de la expresión se realizó mediante densitometría de geles comparando la amplificación mediante RT-PCR del gen analizado con la expresión de la beta actina. Las señales de amplificación de este último gen permitieron normalizar los niveles de expresión de genes de resistencia y cuantificar las “veces” que un determinado gen sobreexpresa. Además, el estudio de beta-actina nos permitió determinar la integridad del ARN obtenido.

### **9. 1. Modulación de la expresión de MDR1 por paclitaxel y carboplatino en líneas derivadas de CPCNP.**

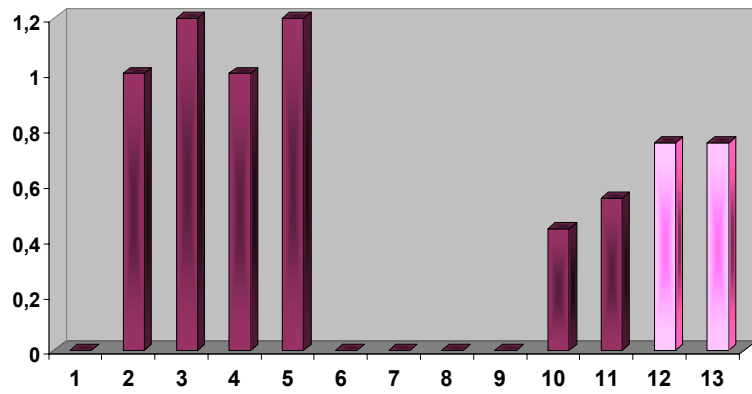
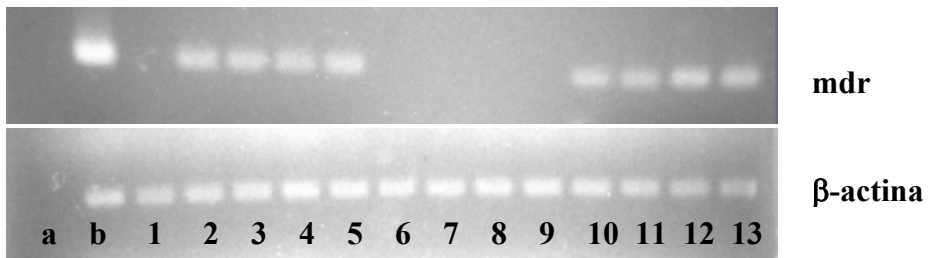
La línea A-549 se caracterizó por no presentar expresión basal de los genes relacionados con la resistencia a drogas MDR1, LRP y BCRP. Los estudios realizados con esta línea (Figura 16) demuestran que la exposición a paclitaxel a concentraciones plasmáticas es capaz de inducir la expresión de MDR1 en tan sólo 3h siendo la ratio (ratio MDR1/beta-actina) de  $0.44 \pm 0.03$ . Esta ratio se incrementó ligeramente con el aumento del tiempo de exposición llegando a un  $0.75 \pm 0.04$  a las 24 h y manteniéndose en estos niveles a las 48 h. Por el contrario, la utilización de carboplatino no indujo ningún nivel de expresión de MDR1 en la línea A-549 a lo largo de la exposición (Figura 16). El estudio realizado mediante la combinación de ambos agentes en los mismos tiempos de exposición nos permitió observar que, no sólo se inducía la expresión de MDR1 en las líneas celulares, sino que el nivel de expresión era mayor que cuando se utilizaba sólo el paclitaxel. Así, la exposición a paclitaxel

y carboplatino a concentraciones plasmáticas provocó una ratio de expresión MDR1/beta-actina de  $1\pm 0.02$  a las 3 h que se mantuvo a lo largo de la exposición llegando a  $1.2\pm 0.08$  a las 48 h. Esto indica una potenciación del desarrollo de resistencia a drogas en esta línea inducido por la asociación de ambos fármacos.

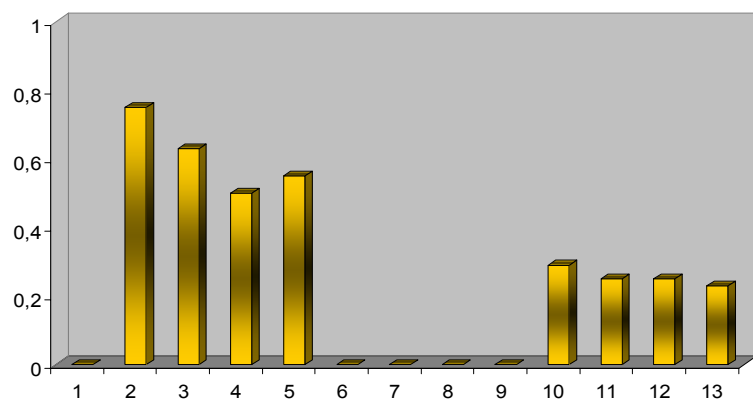
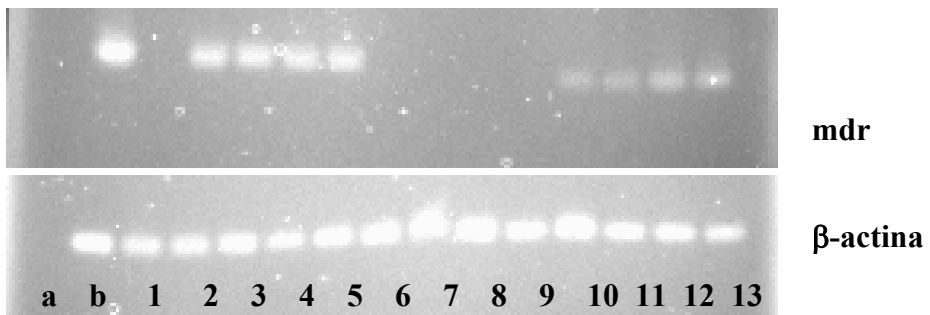
Resultados similares aunque menos significativos, fueron encontrados en la línea A-427. Como se muestra en la Figura 16, cuando fue sometida a la presión mediante la adición de paclitaxel al medio de cultivo se pudo observar un cambio significativo en este patrón. La ratio de expresión MDR1/beta actina fue de  $0.29\pm 0.01$  a las 3 h, ratio que se mantuvo prácticamente constante a lo largo de la exposición. Al igual que en A-549 la utilización de carboplatino no provocó sobreexpresión de MDR1. Por otra parte, fue muy significativo el aumento de expresión de este gen cuando se utilizó el tratamiento combinado (paclitaxel/carboplatino) llegando a alcanzar la ratio un  $0.75\pm 0.03$  a las 3 h de exposición, lo que sugiere también algún mecanismo de potenciación de la resistencia en esta línea celular.

Por último la línea NODO no presentó niveles detectables de genes de resistencia mediante RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 16 la exposición de la línea a paclitaxel originó niveles de expresión de MDR1 que se asemejaron a los encontrados en la línea A-549. Así, a las 3 horas, la ratio se situó en un  $0.69\pm 0.03$ , ratio que se mantuvo estable hasta las 48 h ( $0.74\pm 0.04$ ). Sólo a las 24 h encontramos una disminución significativa de la expresión ( $0.34\pm 0.01$ ) que no se observó en ninguna de las otras dos líneas. La exposición a la droga carboplatino no ejerció ningún efecto sobre la expresión de MDR1 como en los casos anteriores. Sin embargo, y de forma sorprendente, la asociación de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas provocó un notable aumento en la expresión de MDR1 que se situó en una ratio de  $3.5\pm 0.03$  a las 3 h de exposición y que además fue aumentando significativamente en tiempos posteriores hasta situarse en un rango de  $6.1\pm 0.05$  a las 48 h.

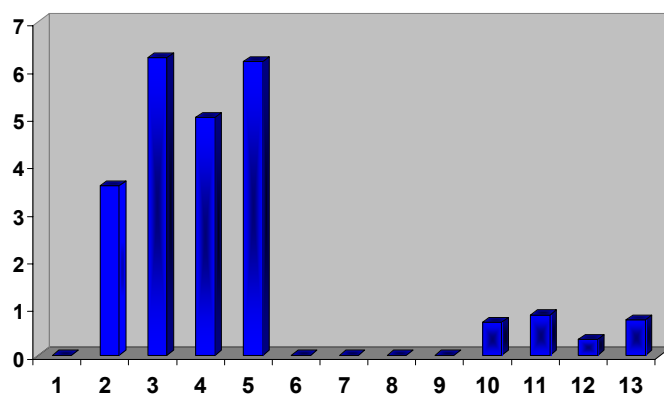
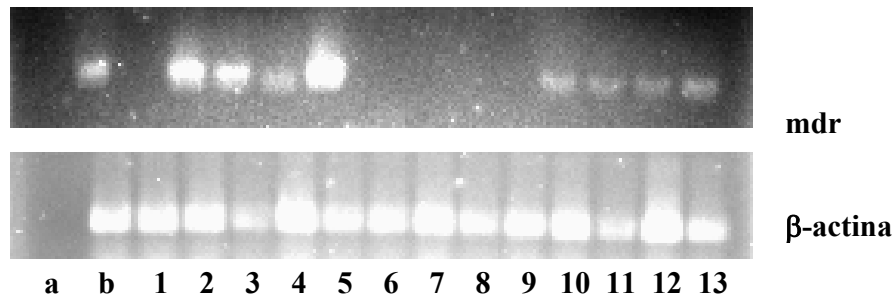
**A** Línea A-549



**B** Línea A-427



C Línea NODO



**Figura 16.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen MDR1 en líneas de CPCNP: A. A-549; B. A-427; C: NODO. La imagen muestra la electroforesis de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para teñir el producto de la PCR. La integridad del fue asegurada mediante una amplificación paralela usando primers específicos de *b-actin*. Las líneas fueron expuestas a la combinación de paclitaxel más carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 2 a 5); a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 6 a 9); y a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 10 a 13). Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 corresponde a la línea CPNCP parental sin tratamiento. La gráfica representa el estudio densitométrico de las bandas de PCR que fueron cuantificada y normalizada teniendo como referencia las bandas de beta-actina.

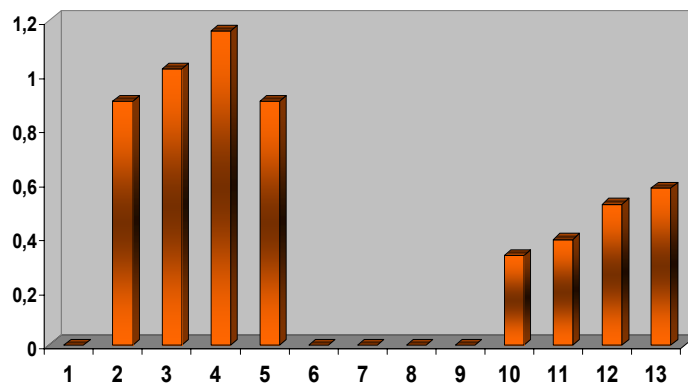
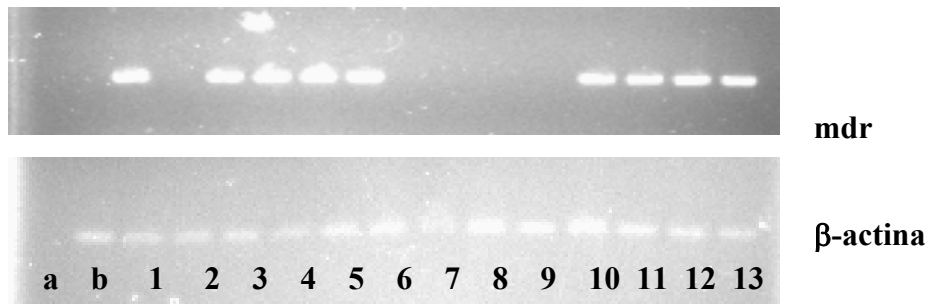
## 9. 2. Modulación de la expresión de MDR1 por paclitaxel y carboplatino en líneas no derivadas de CPCNP.

Para determinar si el tratamiento de uso habitual en pacientes con CPCNP basado en la asociación de paclitaxel y carboplatino origina un característico patrón de resistencia no sólo en el tejido pulmonar sino en otros tejidos, se realizaron experiencias con las líneas tumorales de cáncer de mama, seminoma y cáncer gástrico. La exposición fue a las mismas concentraciones y tiempos que las realizadas para las líneas pulmonares. En general, observamos que el comportamiento de todas ellas fue similar, confirmando que el efecto que los fármacos testados ejercen sobre los genes de resistencia, es parecido en pulmón y en otros tejidos.

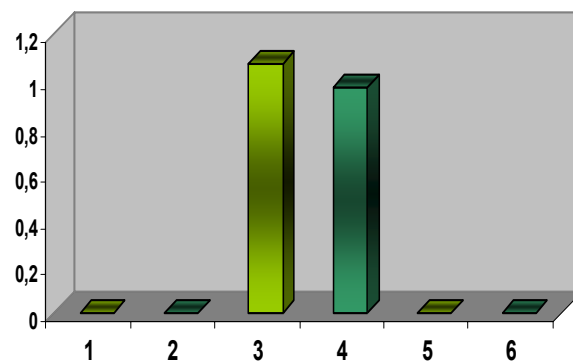
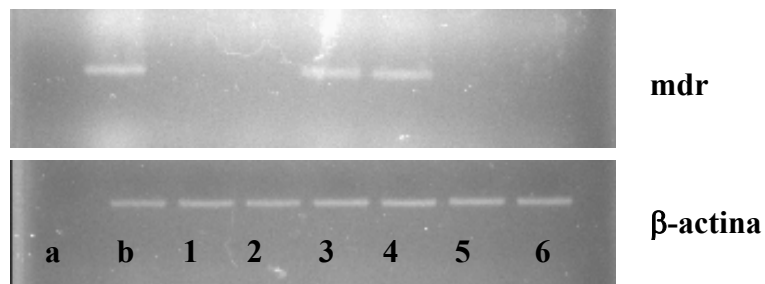
Como se puede observar en la Figura 17, la línea MCF7 derivada de un carcinoma mamario fue negativa para todos los genes de resistencia testados incluyendo MDR1 y MRP3. La exposición a concentraciones plasmáticas de paclitaxel indujo una notable expresión de MDR1 que, además y a diferencia de lo observado en las líneas de cáncer de pulmón, aumentó progresivamente con el tiempo de exposición pasando de una ratio MDR1/beta actina de  $0.33\pm 0.03$  a las 3 h a una de  $0.58\pm 0.02$  a las 48 h. Por otra parte el carboplatino no produjo ningún efecto sobre la expresión de MDR1 al menos en las concentraciones y tiempo de exposición analizados. Sin embargo, la asociación de paclitaxel y carboplatino provocó un incremento en la expresión de MDR1 mayor que el observado sólo con paclitaxel. Este aumento ya fue detectable a las 3 h ( $0.9\pm 0.03$ ) y fue máximo a las 24 h con una ratio de  $1.16\pm 0.04$ .

Los restantes ensayos fueron realizados con las líneas de seminoma (SEM) y carcinoma gástrico (GAS). Estas células mostraron no tener expresión de ninguno de los genes de resistencia testados (Figura 17). El estudio en estas líneas fue realizado tan sólo a un tiempo de exposición (6 h) pudiéndose demostrar que al menos en este tiempo paclitaxel provocó una ligera expresión de MDR1 mientras que carboplatino no afectó a este gen. Tal y como se ve en la Figura 17, SEM mostró una ratio de  $1.07\pm 0.03$  mientras en células GAS fue de  $0.97\pm 0.02$  lo que indica una respuesta muy parecida de ambas líneas frente al fármaco y superior a la encontrada en MCF7.

A Línea MCF-7



B Líneas SEM y GAS



**Figura 17.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen MDR1 en líneas no derivadas de CPCNP. La imagen muestra la electroforesis de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para teñir el producto de la PCR. La integridad del ARN fue asegurada mediante una amplificación paralela usando primers específicos de β-actina. A. La línea MCF7 fue expuesta a

paclitaxel más carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 2 a 5); sólo a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 6 a 9); y sólo a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 10 a 13). Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 corresponde a la línea CPCNP parental sin tratamiento. B. La línea SEM y GAS fueron expuestas a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 6 h (líneas 3 y 4, respectivamente) y a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 6 h (líneas 5 y 6, respectivamente); Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 y 2 corresponden a las líneas parentales SEM y GAS sin tratamiento. La gráfica representa el estudio densitométrico de las bandas de PCR que fueron cuantificadas y normalizadas teniendo como referencia las bandas de beta-actina.

### **9. 3. Modulación de la expresión de MRP3 por paclitaxel y carboplatino en líneas derivadas de CPCNP.**

El comportamiento de la expresión de MRP3 en las líneas tumorales de cáncer de pulmón siguió un patrón específico en cuanto su modulación por los agentes antitumorales ensayados aunque su comportamiento fue más irregular que MDR1. En general fue sobreexpresado por la acción del carboplatino, mientras que el paclitaxel no tuvo efecto sobre él. La asociación de ambos fármacos provocó modulaciones en su expresión que dependieron de la línea celular.

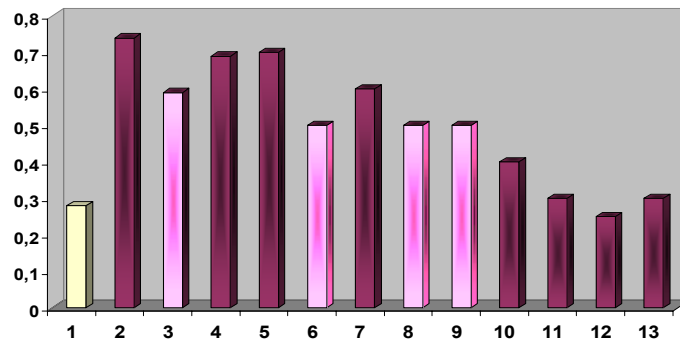
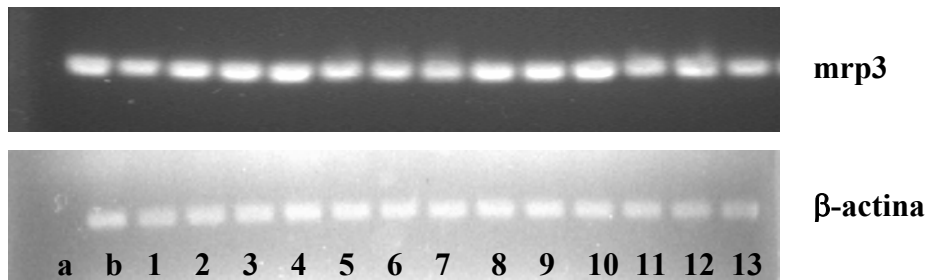
La línea A-549 expresó débilmente MRP3 de forma constitutiva siendo estimada su ratio MRP3/beta actina en un  $0,28 \pm 0.02$ . Como se observa en la Figura 18A, el tratamiento con carboplatino a concentraciones plasmáticas provocó un aumento en la expresión de este gen que fue máximo a las 3h ( $0.5 \pm 0.04$ ) y que prácticamente no se modificó a lo largo de la exposición. Las concentraciones plasmáticas de paclitaxel no indujeron prácticamente modificación alguna en la expresión basal del gen. Por último, la asociación de carboplatino más paclitaxel dió como resultado un incremento en la expresión, aunque analizado en cada uno de los tiempos de exposición no fue significativo.

Algo similar ocurrió en la línea A-427 en la que no se observó expresión basal de MRP3. La exposición a carboplatino originó un aumento en la expresión de este gen con una ratio de entre  $0.8 \pm 0.02$  y  $1.1 \pm 0.023$  (3h a 24h),

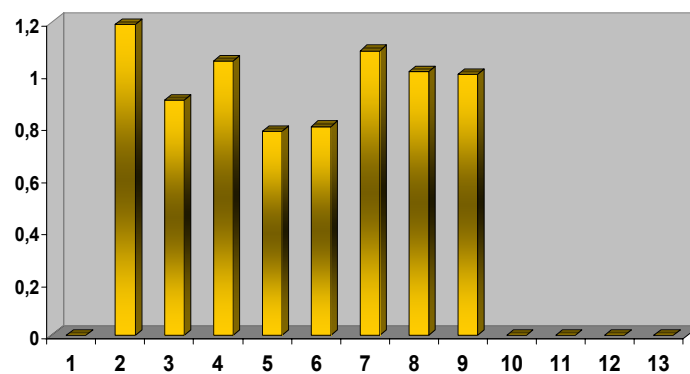
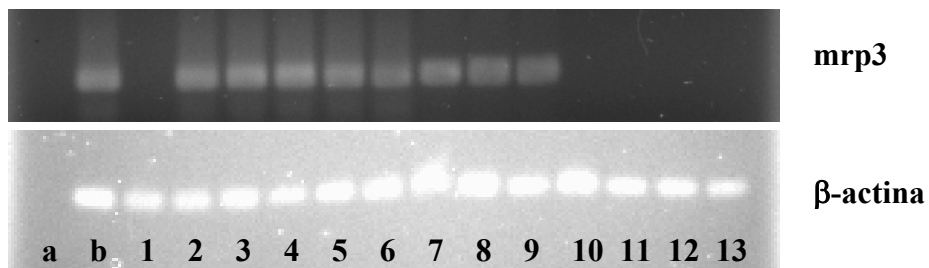


que sin embargo prácticamente no se modificó cuando se asoció al tratamiento de carboplatino el agente paclitaxel. Este último por si sólo no incrementó la expresión de MRP3 (Figura 18B).

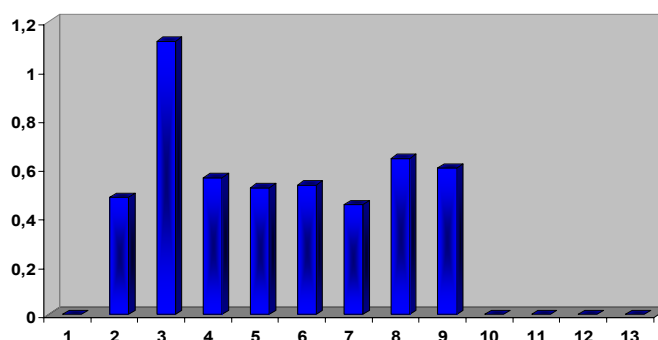
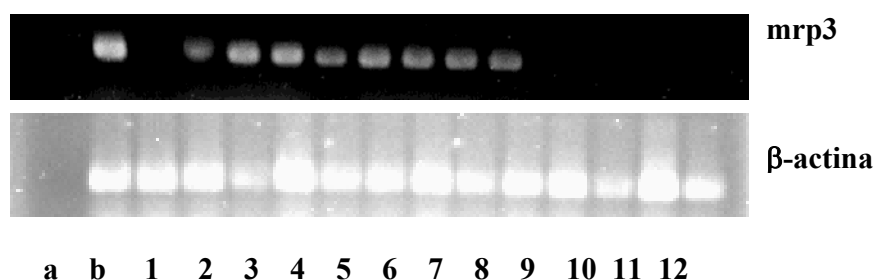
**A** Línea A-549



**B** Línea A-427



### C Línea NODO



**Figura 18.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen MRP3 en líneas de CPNCP: A. A-549; B. A-427; C: NODO. La imagen muestra la electroforesis de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para teñir el producto de la PCR. La integridad del RNA fue asegurada mediante una amplificación paralela usando primers específicos de *b-actin*. Las líneas fueron expuestas a la combinación de paclitaxel más carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 2 a 5); a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 6 a 9); y a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 10 a 13). Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 corresponde a la línea CPNCP parental sin tratamiento. La gráfica representa el estudio densitométrico de las bandas de PCR que fueron cuantificadas y normalizadas teniendo como referencia las bandas de beta-actina.

Por último, en la línea NODO (Figura 18C) pudimos observar como el carboplatino inducía la expresión de MRP3 con exposiciones muy cortas (3 h) y con ratios parecidas a los de A-427. El paclitaxel no indujo la expresión del gen y la asociación de ambos no modificó significativamente su expresión. Sólo dentro de esta última experiencia encontramos una ratio de  $1.12 \pm 0.04$  a las 3 h de exposición que es contraria al patrón encontrado en todas las líneas analizadas y que no podemos explicar.

#### **9. 4. Modulación de la expresión de MRP3 por paclitaxel y carboplatino en líneas no derivadas de CPCNP**

En general, el patrón encontrado en las líneas no derivadas de cáncer de pulmón fue muy similar al descrito previamente. En la línea MCF-7, el carboplatino provocó un aumento de la expresión de MRP3 que fue máximo a las 24 h ( $1.18 \pm 0.04$ ) (Figura 19A). En relación a este valor la sobrepresión de MRP3 inducida por la asociación paclitaxel y carboplatino no fue significativa. El paclitaxel de forma individual no indujo la expresión de MRP3.

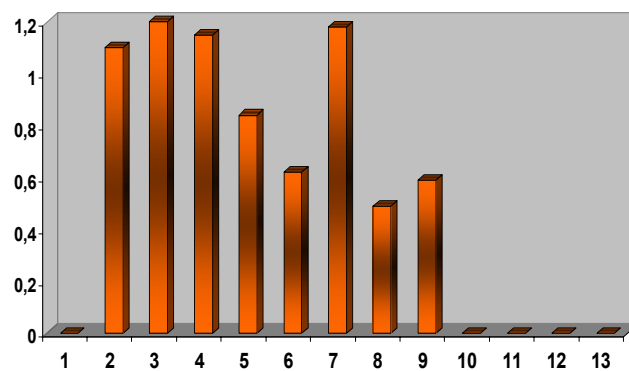
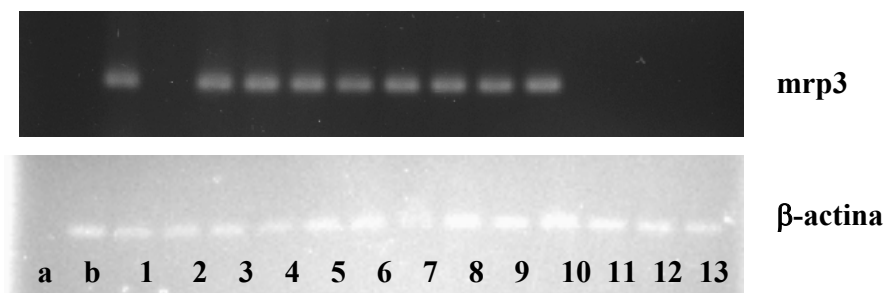
Por último, las experiencias realizadas con las líneas SEM y GAS para MRP3 demostraron que paclitaxel a las 6h de exposición no indujo expresión de MRP3, mientras que carboplatino claramente aumentó la expresión de este gen en la línea SEM. Los resultados fueron difíciles de valorar en la línea GAS. En cualquier caso las ratios MRP3/beta actina fueron muy bajas, indicando un menor efecto del fármaco en estos tipos celulares (Figura 19B).

#### **10. MODULACIÓN GÉNICA EN PACIENTES CON CPCNP TRATADOS CON PACLITAXEL Y CARBOPLATINO. ANÁLISIS MEDIANTE ARRAY.**

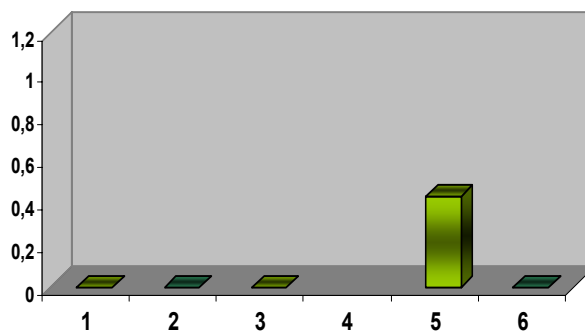
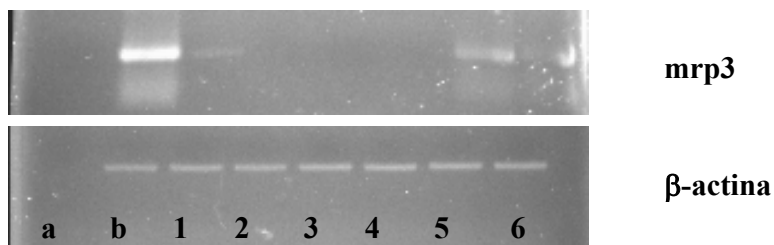
Con el objetivo de analizar los posibles cambios de expresión génica que el tratamiento quimioterápico de paclitaxel más carboplatino produce en los pacientes con CPCNP y, determinar si entre estos genes se encuentran los relacionados con la resistencia a drogas, se realizó un estudio mediante array.

El estudio fue realizado en PMN obtenidos de la sangre periférica de pacientes antes del tratamiento (T0) y 21 días después del tratamiento (T21). Se compararon los resultados obtenidos entre ellos y con muestras de pacientes sanos (control) que fueron cedidas por el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. La extracción de ARN, su cuantificación y el proceso de detección de la expresión de los diferentes genes se realizó tal y como se ha descrito en Material y Métodos.

A Línea MCF-7



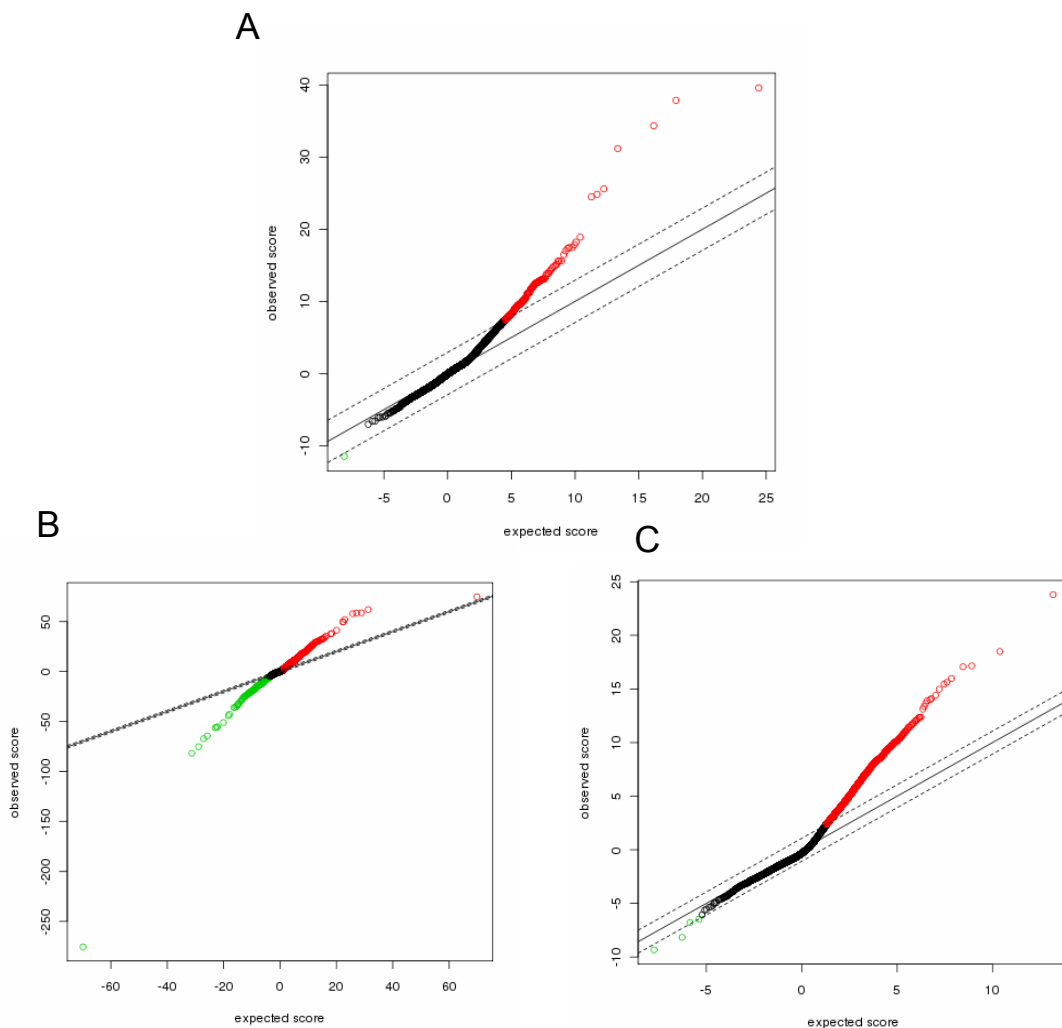
B Línea SEM y GAS



**Figura 19.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen MRP3 en líneas no derivadas de CPCNP. La imagen muestra la electroforesis de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para teñir el producto de la PCR. La integridad del ARN fue asegurada mediante una amplificación paralela usando primers específicos de *b-actin*. A. La línea MCF7 fue expuesta a paclitaxel más carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 2 a 5); sólo a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 6 a 9); y sólo a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 3, 6, 24 y 48 horas (líneas 10 a 13). Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 corresponde a la línea CPCNP parental sin tratamiento. B. La línea SEM y GAS fueron expuestas a paclitaxel a concentraciones plasmáticas durante 6 h (líneas 3 y 4, respectivamente) y a carboplatino a concentraciones plasmáticas durante 6 h (líneas 5 y 6, respectivamente); Las líneas a y b representan el control negativo y el positivo. La línea 1 y 2 corresponden a las líneas parentales SEM y GAS sin tratamiento. La gráfica representa el estudio densitométrico de las bandas de PCR que fueron cuantificada y normalizada teniendo como referencia las bandas de beta-actina.

### **10.1. Valoración general de la modulación de la expresión génica en pacientes con CPCNP.**

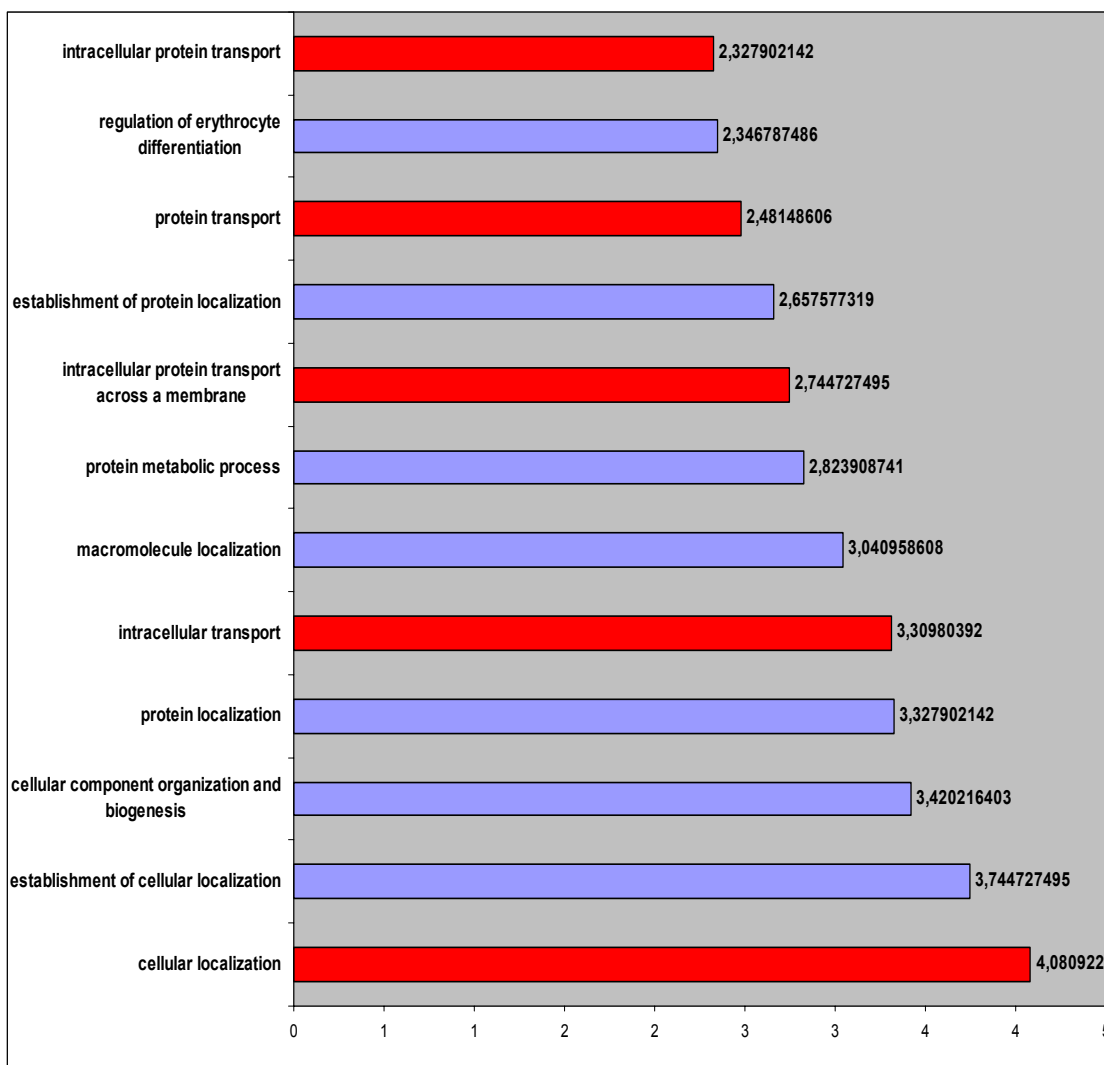
Tras el procesamiento de los datos se obtuvieron valores numéricos que nos permitieron establecer un criterio de selección de genes diferencialmente expresados (DEG, Differentially Expressed Genes). En nuestro caso fueron los genes con valores iguales o mayores a 2 veces en relación al control (tanto genes inducidos como los reprimidos). La Figura 20 muestra una representación gráfica de los resultados de los arrays realizados, comparando la expresión génica de personas sanas (control), pacientes con CPCNP antes del tratamiento (T0) y pacientes con CPCNP después de 21 días del tratamiento con carboplatino y paclitaxel (T21).



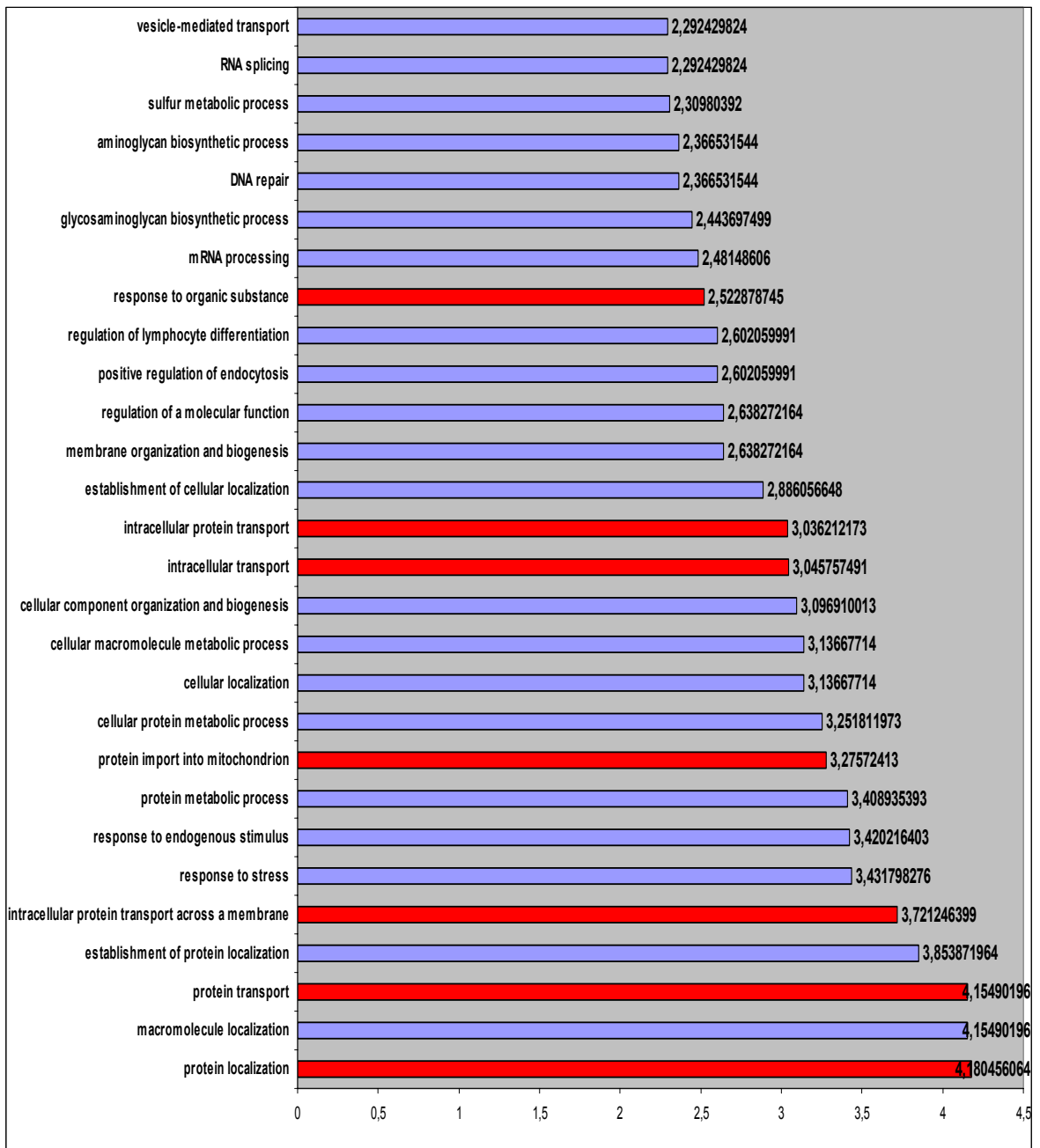
**Figura 20.** Representación gráfica de la diferente expresión génica en sangre periférica de pacientes sanos (Control) y con CPCNP antes del tratamiento (T0) y después de 21 días de tratamiento con paclitaxel y carboplatino (T21). Las gráficas representan el estudio mediante array de A: Control versus T0; B: T0 versus T21 y C: Control versus T21. La representación gráfica contempla los genes que no sufren modificación en su expresión (negro), los genes sobreexpresados (rojo) y los genes subexpresados (verde).

Los genes fueron agrupados basándonos en su función biológica y usando la información de <http://fatigo.bioinfo.cipf.es>. Las figuras 21,22 y 23 recogen los niveles de sobreexpresión (veces que se sobreexpresan en relación al control) de los genes en los tres estudios comparativos llevados a cabo: T0 versus grupo control, T21 versus T0 y T21 versus grupo control. En una primera aproximación y en relación a los patrones de expresión génica que nos interesan en nuestro estudio, debemos destacar dos hechos: 1) en el primer

estudio basado en el array T0 versus grupo control, los pacientes con CPCNP presentan sobrepresados los genes que codifican para proteínas relacionadas con el transporte entre 2.2 y 3.3 veces respecto a los pacientes sanos; 2) en el segundo estudio basado en los array T21 versus T0 se pudo observar como de nuevo las proteínas relacionadas con el transporte celular se encontraban sobrepresadas en pacientes con CPCNP tras el tratamiento, en relación a esos mismos pacientes antes del tratamiento. La sobrepresión, que llegó a ser de hasta 4.5 veces, fue mayor que la observada en el estudio anterior.

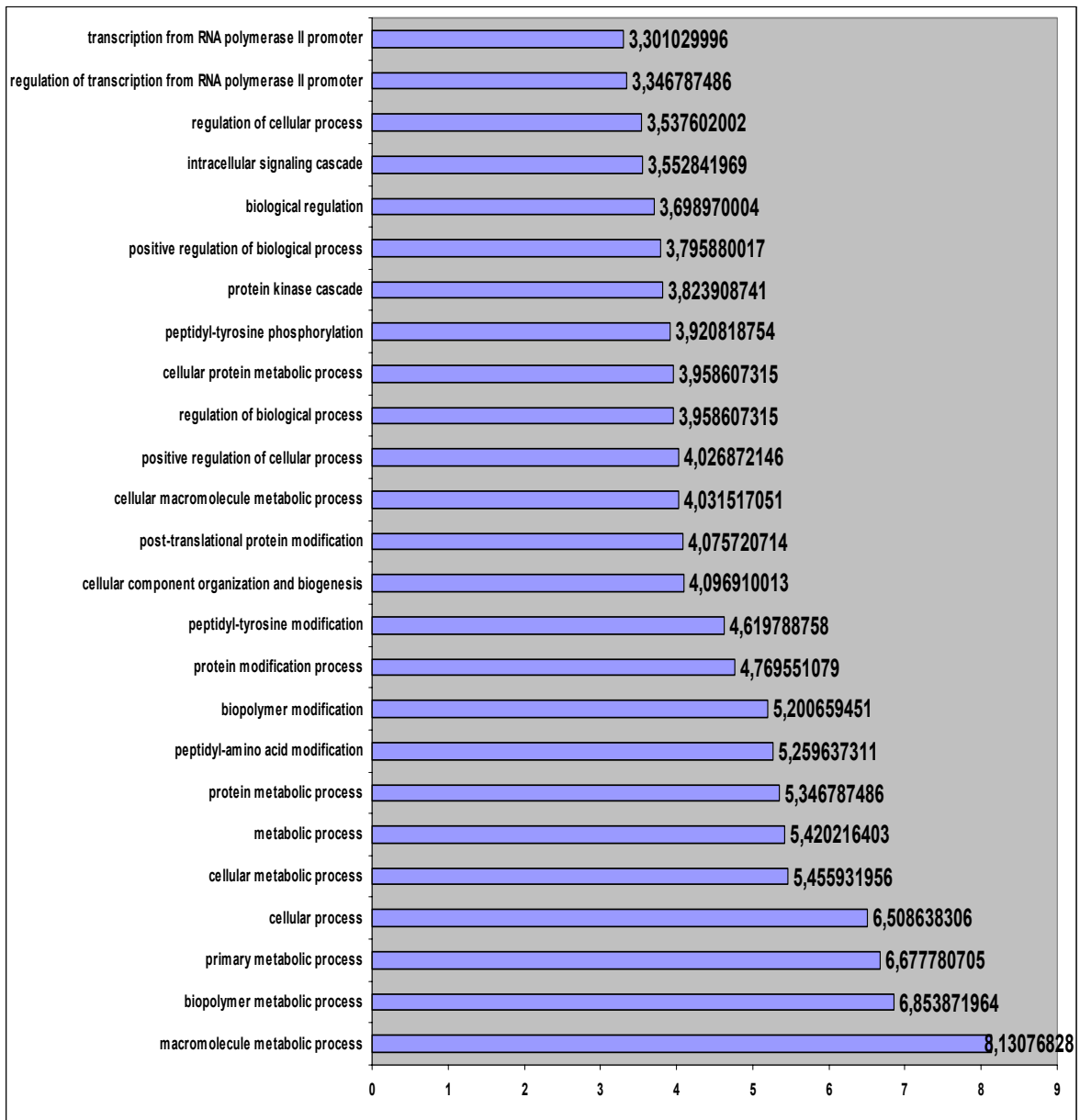


**Figura 21.** Representación gráfica del estudio mediante array de la modificación de la expresión génica en sangre periférica de pacientes con CPCNP antes del tratamiento (T0) versus grupo de estudio de personas sanas (Control). Se indican las familias de genes que se sobrepresan por encima o igual a 2 veces.



**Figura 22.** Representación gráfica del estudio mediante array de la modificación de la expresión génica en sangre periférica de pacientes con CPCNP después del tratamiento con paclitaxel y carboplatino (T21) versus con CPCNP sin tratamiento (T0). Se indican las familias de genes que se sobreexpresan por encima o igual a 2 veces.





**Figura 23.** Representación gráfica del estudio mediante array de la modificación de la expresión génica en sangre periférica de pacientes con CPCNP tras el tratamiento con paclitaxel y carboplatino (T21) versus personas sanas (Control). Se indican las familias que se sobreexpresan por encima o igual a 2 veces.

## 10.2. Valoración especial de la modulación de la expresión génica de genes de resistencia en pacientes con CPCNP.

Dados los resultados experimentales obtenidos en las líneas tumorales tanto derivadas de CPCNP como de otros tejidos en las que el tratamiento con paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas incrementaba la expresión de genes de resistencia, nuestro estudio en pacientes afectos de cáncer de pulmón se centró en estos genes.

La Tabla1 muestra de forma detallada la expresión de los genes relacionados con resistencia a drogas cuando fueron comparados los grupos de estudio (control, T0 y T21). Un análisis más detallado de los genes modificados en los pacientes con CPCNP tratados en relación a los pacientes control se muestra en la Figura 24.

Unigene	Gene-Bank	Symbol	Description	Control vs T0	T0 vs T21	Control vs T21	Gene Name
Hs.489033	NM_000927	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	X	3.83552284939	X	ABC20/CD243
Hs.709181	NM_004996	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	X	X	X	ABC29/ABCC
Hs.368243	NM_000392	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	X	X	X	ABC30/CMOAT
Hs.463421	NM_003786	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	X	X	1.58767645414	ABC31/EST90757
Hs.368563	NM_005688	ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	X	X	X	ABC33/DKFZp686C1782
Hs.460057	NM_001171	ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	X	X	X	ABC34/AR A
Hs.480218	NM_004827	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	X	X	X	ABC15/ABCP
Hs.171189	NM_001621	AHR	Aryl hydrocarbon receptor	X	X	X	AHR
Hs.563509	NM_001283	AP1S1	Adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	X	X	X	AP19/CLAPS1

Hs.158932	NM_000038	APC	Adenomatous polyposis coli	X	2.02226771968	X	BTPS2/DP2
Hs.496240	NM_000044	AR	Androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; testicular feminization; spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease)	X	X	X	AIS/DHTR
Hs.632446	NM_001668	ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	X	X	0.994567291171	HIF-1beta/HIF1B
Hs.367437	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	X	X	X	AT1/ATA
Hs.631546	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	X	1.6032522862	0.986648704221	Bax zeta
Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	X	0.46385511710	X	Bcl-2
Hs.516966	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1	X	2.01107104558	X	BCL-XL/S
Hs.371914	NM_000386	BLMH	Bleomycin hydrolase	X	X	X	BH/BMH
Hs.194143	NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	X	0.639240115398	1.376744352	BRCA1/BRCC1
Hs.34012	NM_000059	BRCA2	Breast cancer 2, early onset	X	X	2.30208187042	BRCC2/FACD
Hs.523852	NM_053056	CCND1	Cyclin D1	X	X	X	BCL1/D11S287E
Hs.244723	NM_001238	CCNE1	Cyclin E1	X	X	X	CCNE
Hs.19192	NM_001798	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	X	X	1.19854309675	p33(CDK2)
Hs.95577	NM_000075	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	X	X	X	CMM3/PSK-J3
Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	X	X	X	CAP20/CDKN1
Hs.238990	NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	X	X	X	CDKN4/KIP1
Hs.512599	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	X	X	X	ARF/CDK4I
Hs.435051	NM_001800	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	X	X	X	INK4D/p19
Hs.444673	NM_030782	CLPTM1L	CLPTM1-like	X	1.15134695388	X	CRR9/DKFZp666M1010

Hs.72912	NM_000499	<b>CYP1A1</b>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	X	X	X	AHH/AHR R
Hs.1361	NM_000761	<b>CYP1A2</b>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	X	1.5194632867	X	CP12/P3-450
Hs.1360	NM_000767	<b>CYP2B6</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	X	X	X	CPB6/CYP2B
Hs.282409	NM_000769	<b>CYP2C19</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	X	X	X	CPCJ/CYP2C
Hs.282871	NM_000770	<b>CYP2C8</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	X	X	X	CPC8/P450 MP-12
Hs.282624	NM_000771	<b>CYP2C9</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	X	X	X	CPC9/CYP2C
Hs.648256	NM_000106	<b>CYP2D6</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	X	X	X	CPD6/CYP2D
Hs.12907	NM_000773	<b>CYP2E1</b>	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	X	X	X	CPE1/CYP2E
Hs.654391	NM_017460	<b>CYP3A4</b>	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	X	X	X	CP33/CP34
Hs.695915	NM_000777	<b>CYP3A5</b>	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	X	X	X	CP35/P450PCN3
Hs.592364	NM_000791	<b>DHFR</b>	Dihydrofolate reductase	X	X	X	DHFR
Hs.488293	NM_005228	<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	X	2.97082972806	X	ERBB/ERBB1
Hs.701980	NM_005229	<b>ELK1</b>	ELK1, member of ETS oncogene family	X	NEG 0.662400655689	X	Elk1
Hs.89649	NM_000120	<b>EPHX1</b>	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	X	NEG 0.609895385317	1.24581205705	EPHX/EPHX
Hs.446352	NM_004448	<b>ERBB2</b>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	X	X	X	HER-2/HER-2
Hs.118681	NM_001982	<b>ERBB3</b>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	X	X	X	ErbB-3/HER3
Hs.390729	NM_005235	<b>ERBB4</b>	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	X	2.3888320773	1.44093782031	HER4/p180erbB4
Hs.469872	NM_000122	<b>ERCC3</b>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	X	X	X	BTF2/GTF2H

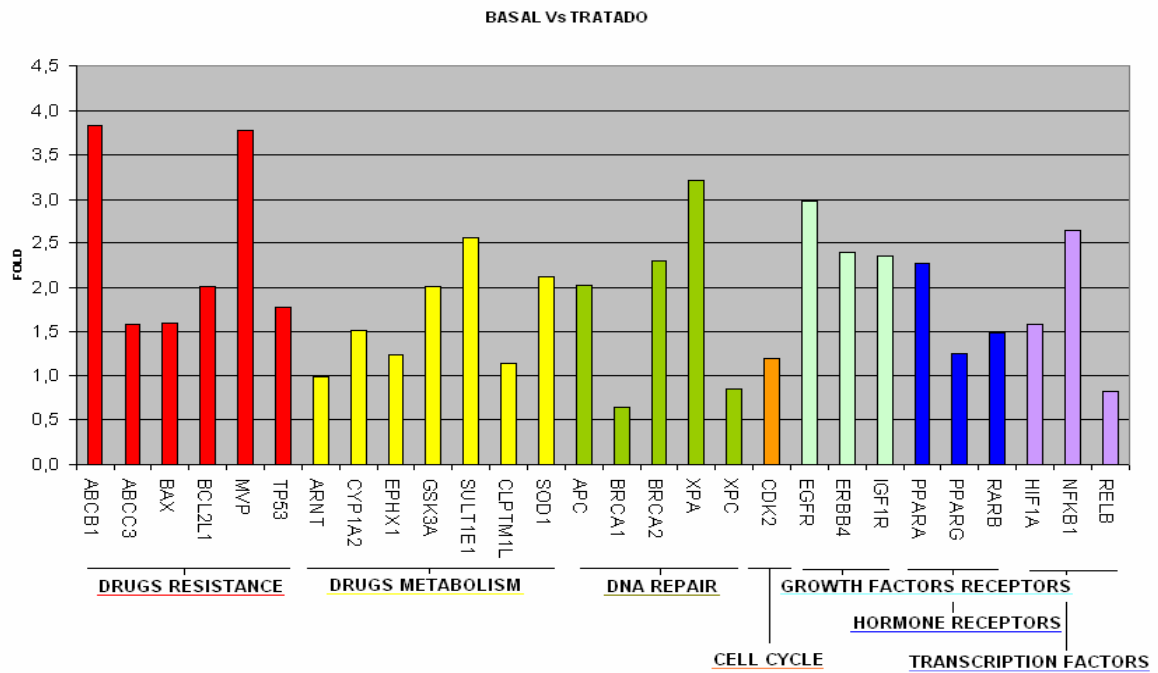
			(xeroderma pigmentosum group B complementing)				
Hs.208124	NM_000125	<b>ESR1</b>	Estrogen receptor 1	X	X	X	DKFZp686N23123/ER
Hs.443150	NM_001437	<b>ESR2</b>	Estrogen receptor 2 (ER beta)	X	X	X	ER-BETA/ESR-BETA
Hs.284244	NM_002006	<b>FGF2</b>	Fibroblast growth factor 2 (basic)	X	- 1.1523521944 2	X	BFGF/FGFB
Hs.25647	NM_005252	<b>FOS</b>	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	X	X	X	c-fos
Hs.466828	NM_019884	<b>GSK3A</b>	Glycogen synthase kinase 3 alpha	X	<b>0.666388236012</b>	<b>2.01081203374</b>	DKFZp686D0638
Hs.523836	NM_000852	<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase pi	X	X		DFN7/FAEES3
Hs.654600	NM_001530	<b>HIF1A</b>	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	X	X	<b>1.59300389758</b>	HIF-1alpha/HIF1
Hs.643120	NM_000875	<b>IGF1R</b>	Insulin-like growth factor 1 receptor	X	<b>2.35207744546</b>	<b>1.70425174851</b>	CD221/IGFIR
Hs.487062	NM_000876	<b>IGF2R</b>	Insulin-like growth factor 2 receptor	X	X	X	CD222/CIMPR
Hs.132966	NM_000245	<b>MET</b>	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	X	X	X	AUTS9/HGFR
Hs.597656	NM_000251	<b>MSH2</b>	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	X	X	X	COCA1/FC1
Hs.632177	NM_017458	<b>MVP</b>	Major vault protein	X	X	<b>3.776600902</b>	LRP/VAULT1
Hs.202453	NM_002467	<b>MYC</b>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	X	X	X	c-Myc
Hs.2	NM_000015	<b>NAT2</b>	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)	X	X	X	AAC2
Hs.654408	NM_003998	<b>NFKB1</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	X	X	<b>2.65669788203</b>	DKFZp686C01211/EBP-1
Hs.73090	NM_002502	<b>NFKB2</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	X	X	X	LYT-10/LYT10

Hs.9731	NM_002503	<b>NFKBIB</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	X	X	X	IKBB/TRIP9
Hs.458276	NM_004556	<b>NFKBIE</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	X	X	X	IKBE
Hs.103110	NM_005036	<b>PPARA</b>	Peroxisome proliferative activated receptor, alpha	1,5452001042	2.273751106	1.27946912631	NR1C1/PPAR
Hs.696032	NM_006238	<b>PPARD</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	X	X	X	FAAR/NR1C2
Hs.162646	NM_015869	<b>PPARG</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	X	1.25490859252	X	NR1C3/PPARG1
Hs.654583	NM_000964	<b>RARA</b>	Retinoic acid receptor, alpha	X	X	X	NR1B1/RAR
Hs.654490	NM_000965	<b>RARB</b>	Retinoic acid receptor, beta	X	1.48729643153	1.04371297703	HAP/NR1B2
Hs.1497	NM_000966	<b>RARG</b>	Retinoic acid receptor, gamma	X	X	X	NR1B3/RARC
Hs.408528	NM_000321	<b>RB1</b>	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	X	X	X	OSRC/RB
Hs.654402	NM_006509	<b>RELB</b>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	X	NEG 0.359938097667	0.825639213225	I-REL
Hs.590886	NM_002957	<b>RXRA</b>	Retinoid X receptor, alpha	X	X	X	NR2B1
Hs.388034	NM_021976	<b>RXRB</b>	Retinoid X receptor, beta	X	X	X	DAUDI6/H-2RIIBP
Hs.443914	NM_000454	<b>SOD1</b>	Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	X	NEG 0.645860927632	2.11689838034	ALS/ALS1
Hs.479898	NM_005420	<b>SULT1E1</b>	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	X	1.22525157428	2.56871997824	EST/EST-1
Hs.204044	NM_003839	<b>TNFRSF11A</b>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	X	X	X	CD265/ODFR

Hs.592136	NM_003286	TOP1	Topoisomerase (DNA) I	X	X	X	TOPI
Hs.156346	NM_001067	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	X	X	X	TOP2/TP2A
Hs.475733	NM_001068	TOP2B	Topoisomerase (DNA) II beta 180kDa	X	X	X	TOPIIB/top2beta
Hs.654481	NM_000546	TP53	Tumor protein p53	X	1.39466776361	1.77138733357	LFS1/TRP53
Hs.444319	NM_000367	TPMT	Thiopurine S-methyltransferase	X	X	X	LOC440956
Hs.654364	NM_000380	XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A	X	X	3.21062195535	XP1/XPAC
Hs.475538	NM_004628	XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	X	X	0.850005956758	XP3/XPCC
Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	X	X	X	B2M
Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	X	X	X	HGPRT/Hprt
Hs.523185	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	X	X	X	RPL13A

**Tabla1.** Estudio de las modulaciones de expresión de genes relacionados con la resistencia en los diferentes estudios realizados. Grupo de personas sanas (Control), con CPCNP antes del tratamiento (T0) y con CPCNP después de 21 días de tratamiento con paclitaxel y carboplatino (T21).

Finalmente nuestro interés se centró en los genes de resistencia a drogas clásicos, seleccionando los genes MDR1, MRP, BCRP y LRP para su estudio. Como se puede ver en la Figura 25 los genes MDR1 y LRP presentan un notable incremento de expresión (3.6 y 3.7 respectivamente) en los pacientes con CPCNP sometidos a tratamiento, situándose ambos en cuatro veces la expresión basal encontrada en los controles sanos. El resto de genes de resistencia presentó un incremento por debajo de 2 veces y por tanto no fueron considerados: MRP 1 un 1.3, MRP 3 un 1.5 y BCRP un 1.8.

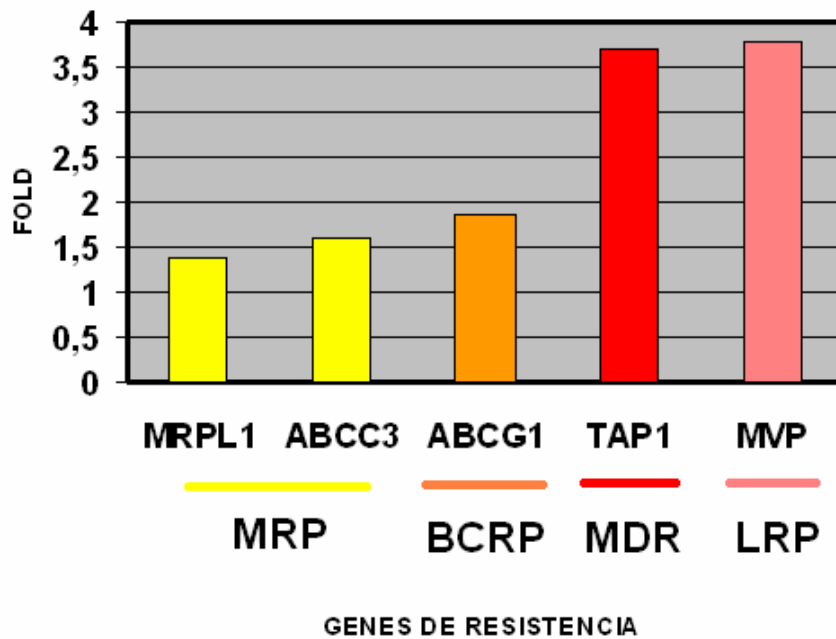


<b>DRUG RESISTANCE</b>	ABCB1	<b>3,8355</b>
	ABCC3	<b>1,5877</b>
	BAX	<b>1,6033</b>
	BCL2L1	<b>2,0111</b>
	MVP	<b>3,7766</b>
	TP53	<b>1,7714</b>
<b>DRUG METABOLISM</b>	ARNT	<b>0,9946</b>
	CYP1A2	<b>1,5195</b>
	EPHX1	<b>1,2458</b>
	GSK3A	<b>2,0108</b>
	SULT1E1	<b>2,5687</b>
	CLPTM1L	<b>1,1513</b>
	SOD1	<b>2,1169</b>
<b>DNA REPAIR</b>	APC	<b>2,0223</b>
	BRCA1	<b>0,6392</b>
	BRCA2	<b>2,3021</b>
	XPA	<b>3,2106</b>
	XPC	<b>0,8500</b>
<b>CELL CYCLE</b>	CDK2	<b>1,1985</b>
	EGFR	<b>2,9708</b>
<b>GROWTH FACTORS RECEPTORS</b>	ERBB4	<b>2,3888</b>
	IGF1R	<b>2,3521</b>
<b>HORMONE RECEPTORS</b>	PPARA	<b>2,2738</b>
	PPARG	<b>1,2549</b>
	RARB	<b>1,4873</b>
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>	HIF1A	<b>1,5930</b>
	NFKB1	<b>2,6567</b>
	RELB	<b>0,8256</b>

**Figura 24.** Modulación de genes relacionados con la resistencia en pacientes CPCNP sometidos a tratamiento quimioterápico.

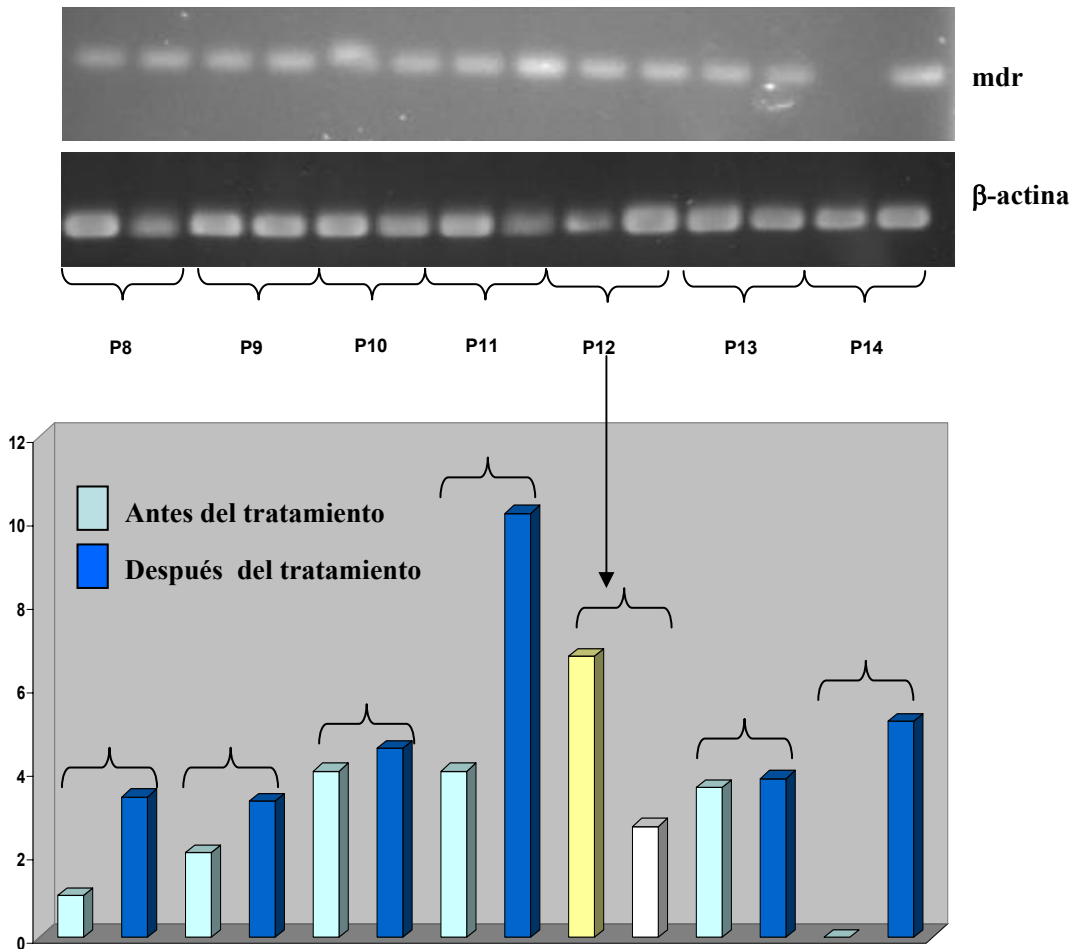


## T0 VERSUS T21



		T21 vs T0	
MRP	MRPL1	1,376414193	cDNA FLJ27008 fis, clone SLV05117
	ABCC3	1,587676454	Zj58f02s1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 cDNA clone IMAGE:454491 3'similar to contains element MER22 repetitive element ;
BCRP	ABCG2	1,850792971	FNPABG02 FNP Homo sapiens cDNA
MDR	TAP1	3,694257921	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP1)
LRP	MVP	3,776600902	major vault protein (MVP), transcript variant 2

**Figura 25.** Representación gráfica de las modificaciones en la expresión de genes de resistencia analizadas mediante array en pacientes con CPCNP después del tratamiento (T21 versus T0)



**Figura 26.** Imagen representativa del estudio densitométrico realizado de las amplificaciones de *mdr1* mediante RT-PCR en pacientes afectados de CPCNP antes y después del tratamiento. Se muestran las bandas de amplificación obtenidas en 7 pacientes que fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa y teñidas mediante bromuro de etidio.

## 11. ESTUDIO DE LA MODULACION EN LA EXPRESIÓN DE MDR1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CPCNP.

En base a los resultados previamente obtenidos y con el objetivo de determinar la validez de la expresión de genes de resistencia en sangre periférica como factor predictivo de respuesta al tratamiento quimioterápico y factor pronóstico en la evolución de pacientes afectados de CPCNP, se realizó un estudio en un grupo homogéneo de pacientes con esta patología mediante la determinación en PMN del gen MDR1 antes y después del tratamiento (ver

Material y Métodos) y siguiendo una modificación del protocolo establecido por Oguri y cols. (2000).

### 11.1. Grupo de estudio. Descripción de las variables independientes.

La edad media de los 23 pacientes fue  $55 \pm 10$  años. La serie estuvo formada por 19 (82,6%) hombres y 4 (17,4%) mujeres. Todos presentaban ECOG 0-1. Todos eran fumadores (95,7%), excepto una mujer no fumadora. Del grupo de estudio, 18 pacientes (82%) no presentaba pérdida de peso en el momento del diagnóstico.

En relación a la histología, 14 pacientes (70%) pertenecían a carcinoma epidermoide, 5 (21,7%) a adenocarcinoma y 1 (4,3%) a carcinoma de células grandes. En 3 pacientes (13%) no se pudo determinar el subtipo histológico dentro de CPCNP.

En lo que se refiere al estadio tumoral en el momento del diagnóstico, 19 (52,2%) se hallaban en estadio IV (6 pacientes con metástasis en distintas localizaciones, 3 con metástasis de localización cerebral, y 3 con metástasis en una sola localización); 2 (8,7%) pacientes en estadio IIIB; 7 (30,4%) pacientes en estadio IIIA (todos ellos afectación ganglionar N2); 2 (8,7%) pacientes en estadio IB.

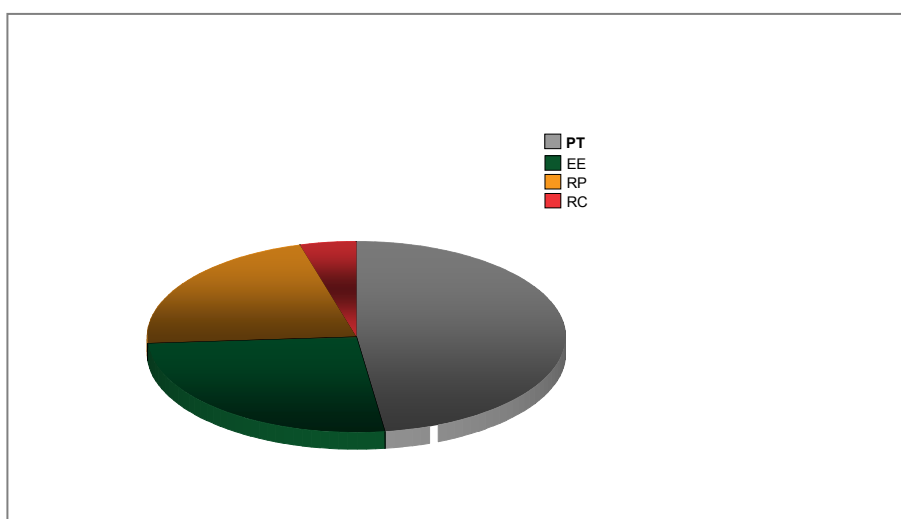
Todos los pacientes recibieron quimioterapia según el esquema Paclitaxel (175-200mg/m<sup>2</sup>) –Carboplatino (AUC5-6). La media de ciclos administrada fue de  $3,7 \pm 1,1$ .

<b>Variables</b>	
<b>Edad</b>	55,48+/-10,5
<b>Sexo</b> Hombre Mujer	19 (82,6%) 4 (17,4%)
<b>ECOG</b> 0 1	18 (78,3%) 5 (21,7%)
<b>Tabaco</b>	

Si	22 (95,7%)
no	1 (4,3%)
<b>Pérdida de peso</b>	
No	19 (82,6)
< 5 kg	3 (13%)
> 5 kg	1 (4,3%)
<b>Histología</b>	
Epidermoide	14 (60,9%)
Adenocarcinoma	5 (21,7%)
Células grandes	1 (4,3%)
No determinado	3(13%)
<b>Estadio</b>	
IB	2 (8,7%)
IIIA	7 (30,4%)
IIIB	2 (8,7%)
IV	12 (52,2%)
<b>Nºciclos</b>	3,78 +/- 1,16

**Tabla 2.** Características de los pacientes de estudio.

Tras el tratamiento, 11 pacientes (47,8%) se evaluaron como progresión tumoral (PT); incluso 6 fallecieron durante el periodo de tratamiento. 6 pacientes (26%) presentaron estabilización tumoral (EE). 5 pacientes (21,7%) obtuvieron respuesta parcial (RP). Un paciente (4,3%) sometido a cirugía radical antes del tratamiento, mantuvo la respuesta completa (RC) (Figura 27).



**Figura 27.** Valoración de respuesta al tratamiento quimioterápico.

Además, en algunos casos, los pacientes recibieron otro tipo de tratamiento. 5 pacientes recibieron Radioterapia torácica concurrente con quimioterapia tras el tratamiento de Paclitaxel- Carboplatino. 4 pacientes recibieron Radioterapia holocraneal al presentar metástasis cerebrales. 4 pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente de su tumor: un paciente con estadio IB antes del tratamiento antineoplásico; y, 2 pacientes tras el tratamiento sistémico, uno con estadio IB y 2 con estadio IIIA. 10 pacientes recibieron tratamiento sistémico posteriormente, con quimioterapia y/o Erlotinib (Tablas 3,4 y 5).

		Frecuencia	Porcentaje
Tratamiento Sistémico	no	13	56,5
	si	10	43,5
	Total	23	100

**Tabla 3.** Tratamiento sistémico posterior.

		Frecuencia	Porcentaje
RT	no	14	60,9
	RT torácica	5	21,7
	RT holocraneal	4	17,4
	Total	23	100

**Tabla 4.** Radioterapia durante el tratamiento.

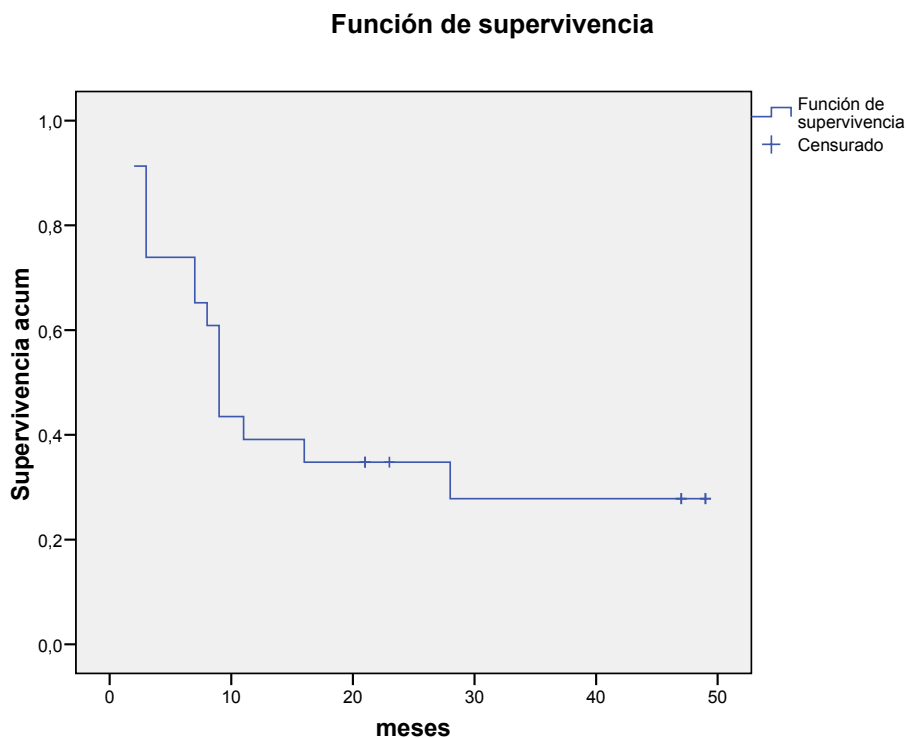
		Frecuencia	Porcentaje
Cirugía	no	19	82,6
	si	4	17,4
	Total	23	100

**Tabla 5.** Cirugía durante el tratamiento.

Con respecto al estado actual de los pacientes, 16 fueron exitus, 2 permanecen vivos con enfermedad y 5 están vivos sin enfermedad (Tabla 6). La probabilidad de llegar vivo al final del estudio en pacientes con estas características es del 27,8%. La mediana de supervivencia es de 9 meses. La supervivencia media es de 20 meses. La probabilidad de estar vivo al final del estudio en pacientes con estadio I y IIIA fue estadísticamente superior a los pacientes con estadio IV (Figuras 28 y 29).

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Pacientes</b>	exitus	16	69,6
	vivo con enfermedad	2	8,7
	vivo sin enfermedad	5	21,7
	Total	23	100,0

**Tabla 6.** Estado actual de los pacientes.



**Figura 28.** Curva de supervivencia global de los pacientes de estudio.

## Funciones de supervivencia

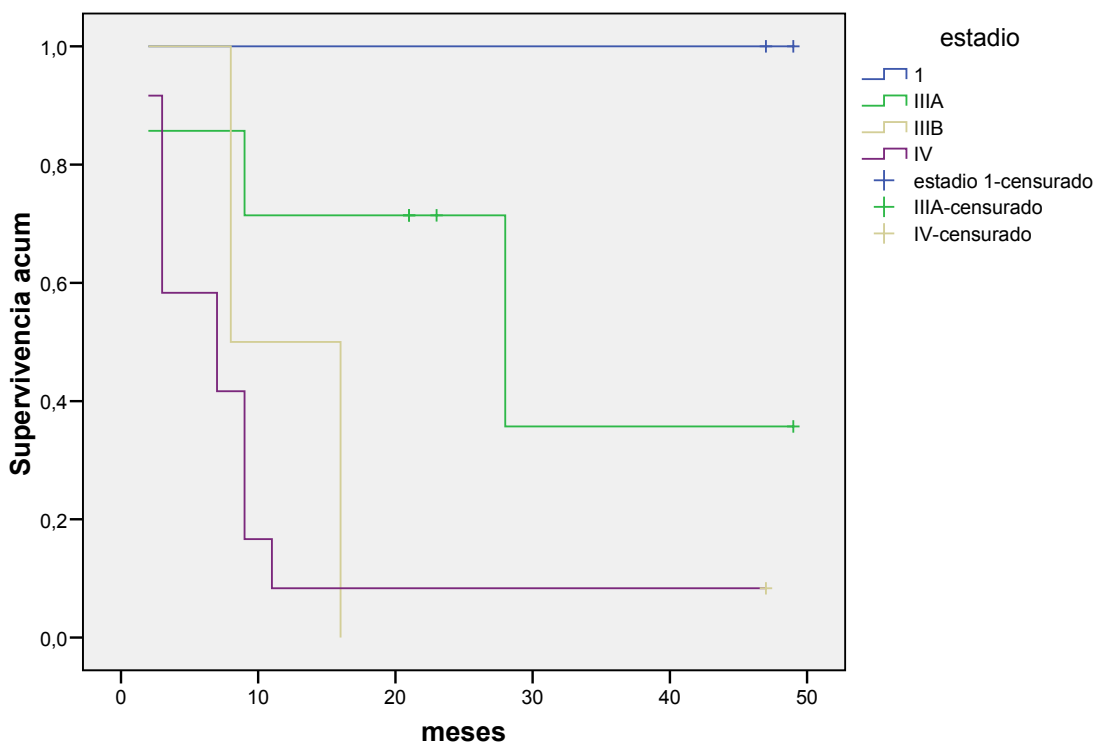
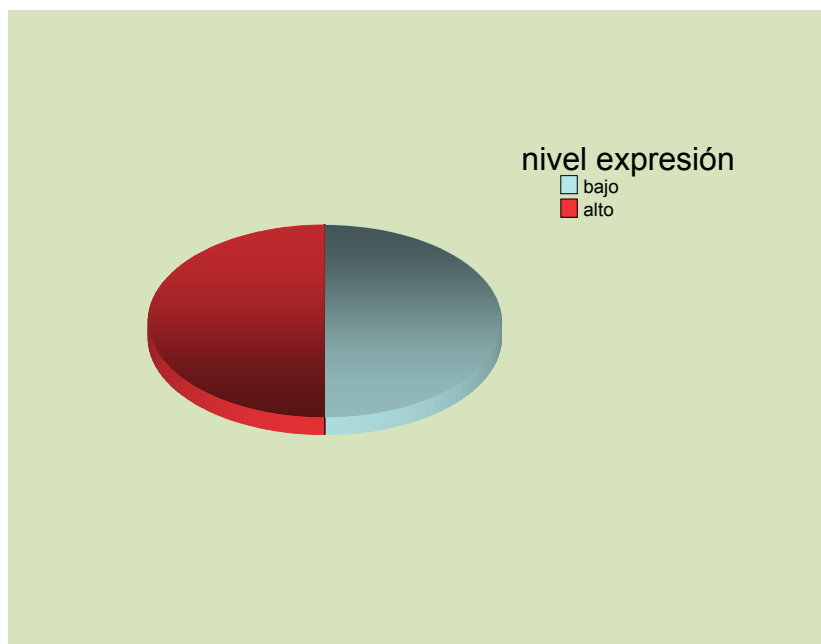


Figura 29. Curvas de supervivencia según el estadio tumoral.

### 11.2. Grupo de estudio. Determinación de los niveles de MDR1 en sangre periférica. Descripción de la variable dependiente.

Se evaluó la expresión de MDR1 en la sangre periférica de los 23 pacientes. En 18 pacientes se determinó antes y después del primer ciclo de tratamiento quimioterápico, y en 5 pacientes antes y después del segundo ciclo. Se realizó determinación prequimioterapia a las 0 horas y determinación postquimioterapia a las 6 horas. Se consideró como grado de expresión la diferencia del valor densitométrico, que representa la modificación sobre el basal. 22 pacientes presentaron expresión de MDR1 y un paciente no presentó expresión.

La Figura 26 representa el estudio mediante RT-PCR y posterior análisis densitométrico de la expresión de MDR1 en los pacientes objetos de estudio antes y después del tratamiento. Para el estudio estadístico se consideraron 2 niveles de expresión establecidos de forma aleatoria: bajo (0-3 ) y alto (> de 4). De los 22 pacientes que mostraron expresión, 11(50%) presentaron niveles bajos y 11 (50%) niveles altos (Figura 30).



**Figura 30.** Nivel de expresión de mdrl en los 22 pacientes con expresión positiva.

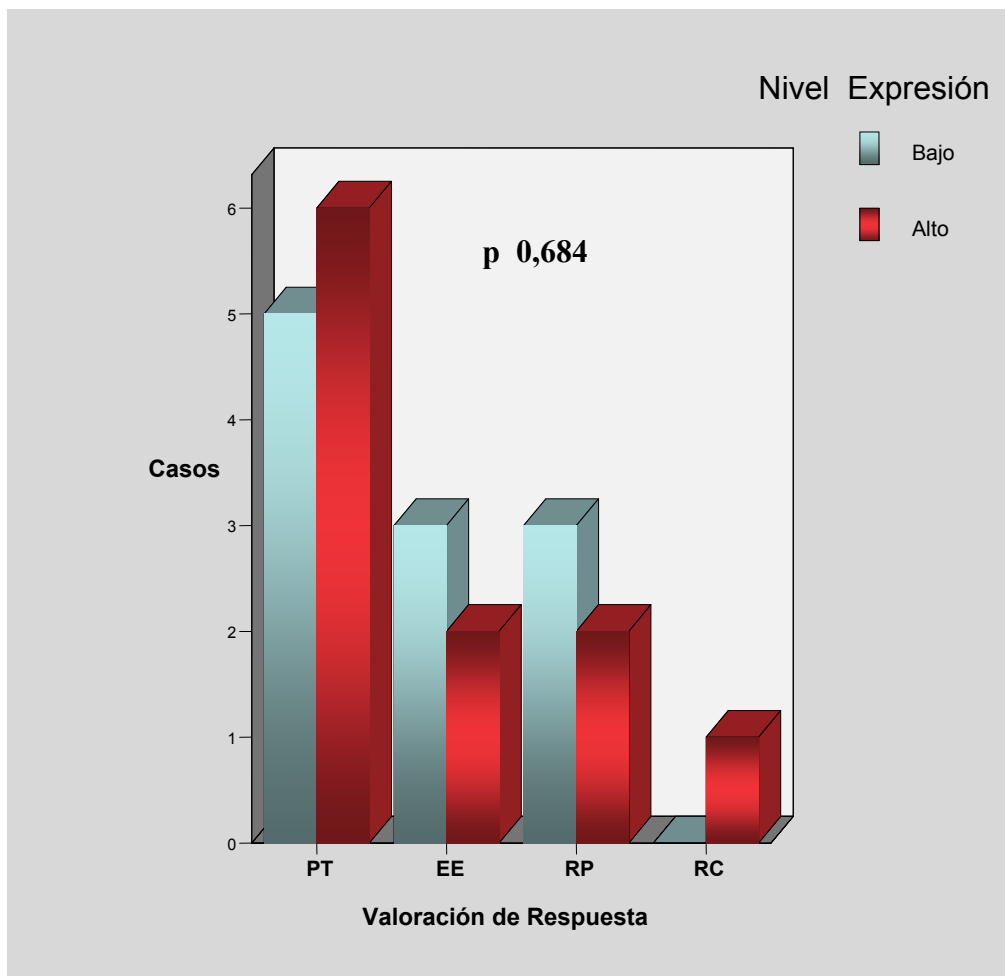
### **11.3. Grupo de estudio. Relación de la expresión de MDR1 y la tasa de respuestas obtenidas con la quimioterapia.**

El objetivo principal del estudio era determinar la relación de los niveles de expresión de MDR1 con la respuesta a la quimioterapia. No se observó una relación estadísticamente significativa entre el grado de expresión de MDR1 y el tipo de respuesta al tratamiento.

De los 11 pacientes que presentaron progresión tumoral a pesar del tratamiento antineoplásico, 5 tenían expresión baja de MDR1 y 6 expresión alta. En relación a los 5 pacientes que se evaluaron como estabilización de la



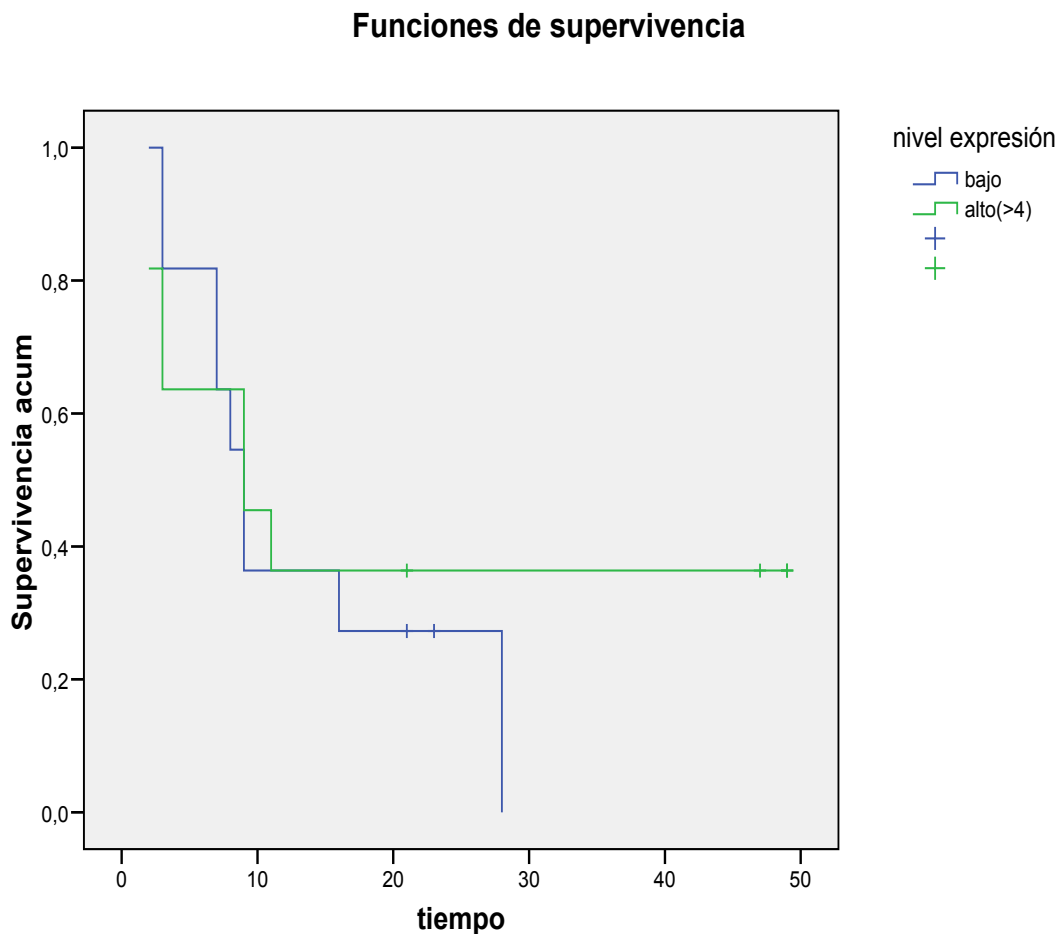
enfermedad, 3 tenían niveles bajos y 2 niveles altos. En cuanto a los 5 pacientes que obtuvieron respuesta parcial, 3 presentaban niveles bajos de MDR1 y 2 niveles altos. El paciente que mantuvo respuesta completa (había recibido cirugía previa) presentaba un nivel de expresión alto (figura 31).



**Figura 31.** Expresión mdr1 en relación a la respuesta a la quimioterapia.

#### 11.4. Grupo de estudio. Relación de la expresión de MDR1 y supervivencia global de los pacientes

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de MDR1 y la supervivencia global. Los pacientes que presentaban un nivel alto de expresión de MDR1 alcanzaron una supervivencia media de 21,3 meses, mientras que los que tenían un nivel de expresión bajo obtuvieron una supervivencia media de solo 13,2 meses (Figura 32; Tabla 7).



**Figura 32.** Supervivencia en relación a la expresión de mdr1.

nivel expresión	Media (meses)				
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	
bajo	13,273	3,068	7,260	19,285	p 0,541
alto(>4)	21,364	6,359	8,900	33,827	
Global	18,511	4,009	10,653	26,369	

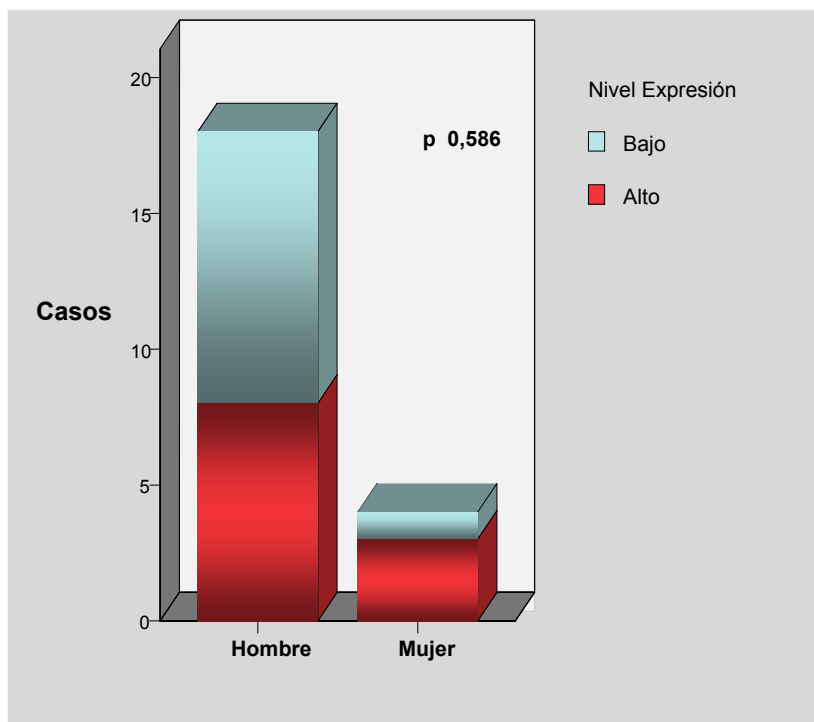
**Tabla 7.** Media de supervivencia en relación a la expresión de mdr1.

### 11.5. Grupo de estudio. Relación de la expresión de MDR1 y el resto de variables independientes

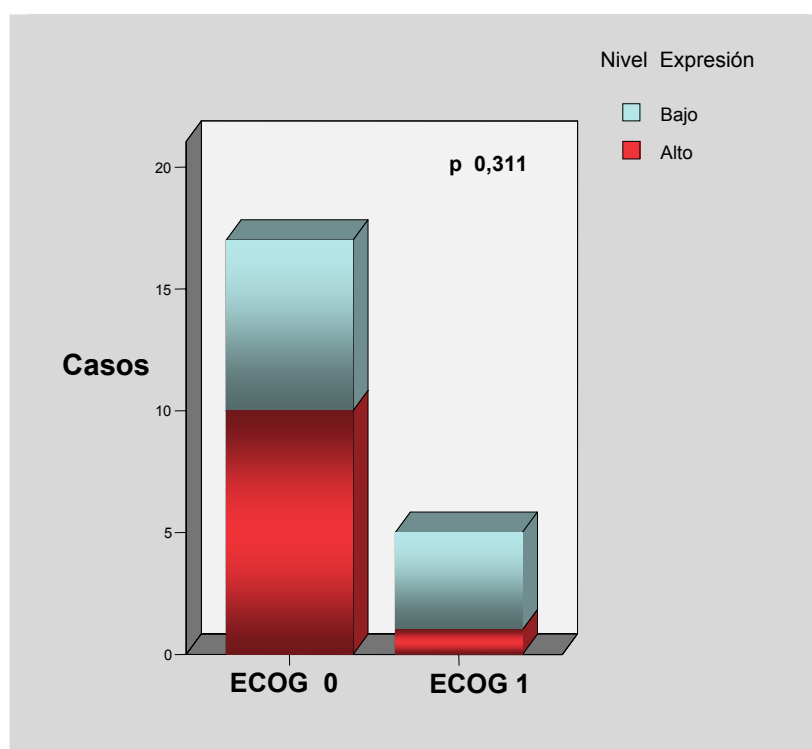
No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre la expresión de MDR1 y las variables independientes sexo, ECOG, hábito tabáquico, pérdida de peso, histología, estadio tumoral y localización metastásica.

En relación al sexo, en el grupo de los hombres, 10 (55,6%) presentaron niveles bajos y 8 (44,4%) altos. De las 4 mujeres, una (25%) presentó nivel bajo y el resto (75%) niveles altos (Figura 33).

Todos los pacientes del estudio presentaban ECOG 0-1. El performans status no se relacionó con el nivel de expresión de forma significativa (Figura 34). De los 17 pacientes con ECOG 0, 7 (41,2%) presentaban niveles bajos y 10 (58,8%) niveles altos. De los 5 pacientes con ECOG 1, 4 (80%) presentaban niveles bajos y 1 (20%) nivel alto (Figura 34).

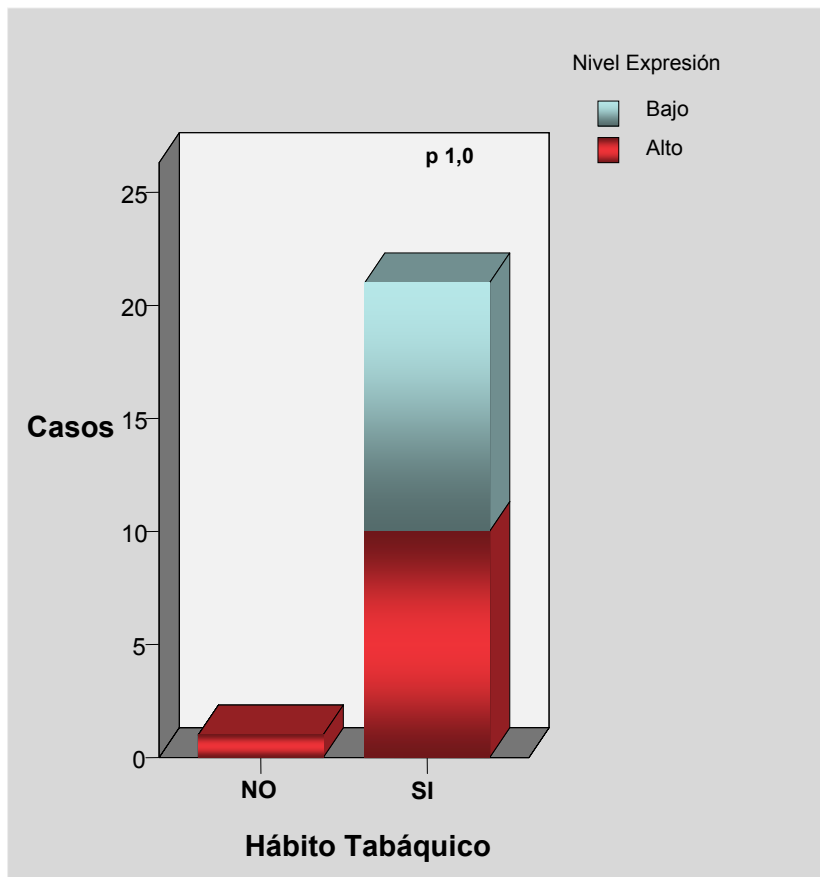


**Figura 33.** Expresión mdr1 en relación al sexo.



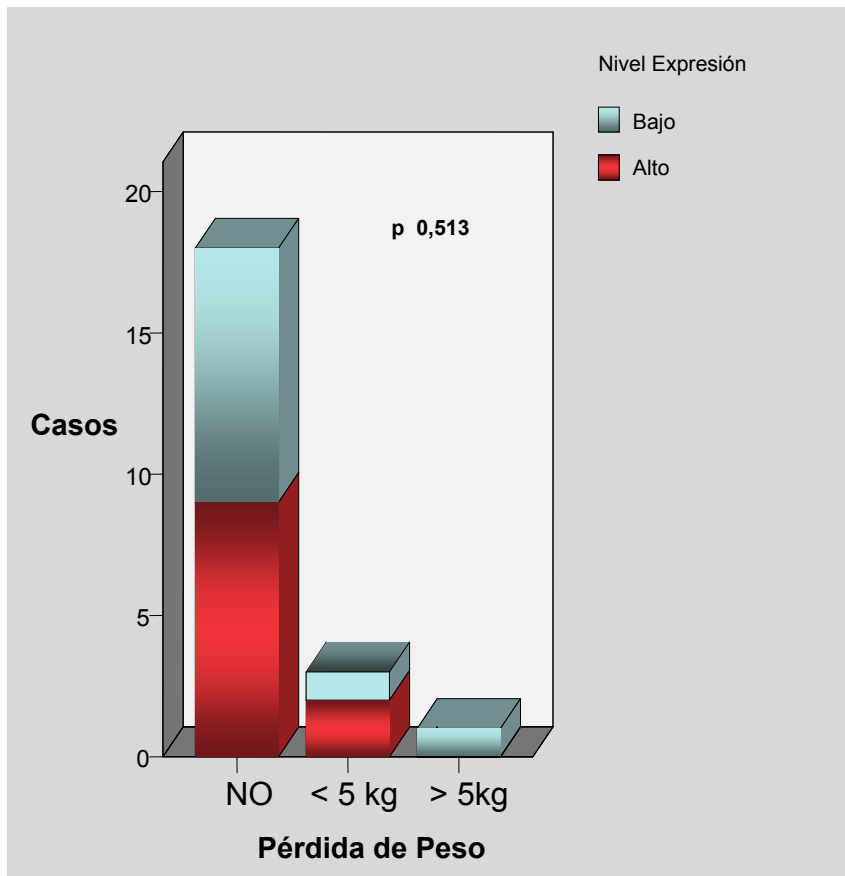
**Figura 34.** Expresión mdr1 en relación al ECOG.

Todos los pacientes eran fumadores, menos una mujer. 11 (52,4%) presentaron niveles bajos de expresión y 10 (47,6%) niveles altos, sin alcanzar significación estadística (Figura 35). La mujer no fumadora presentó niveles altos de expresión (100%).



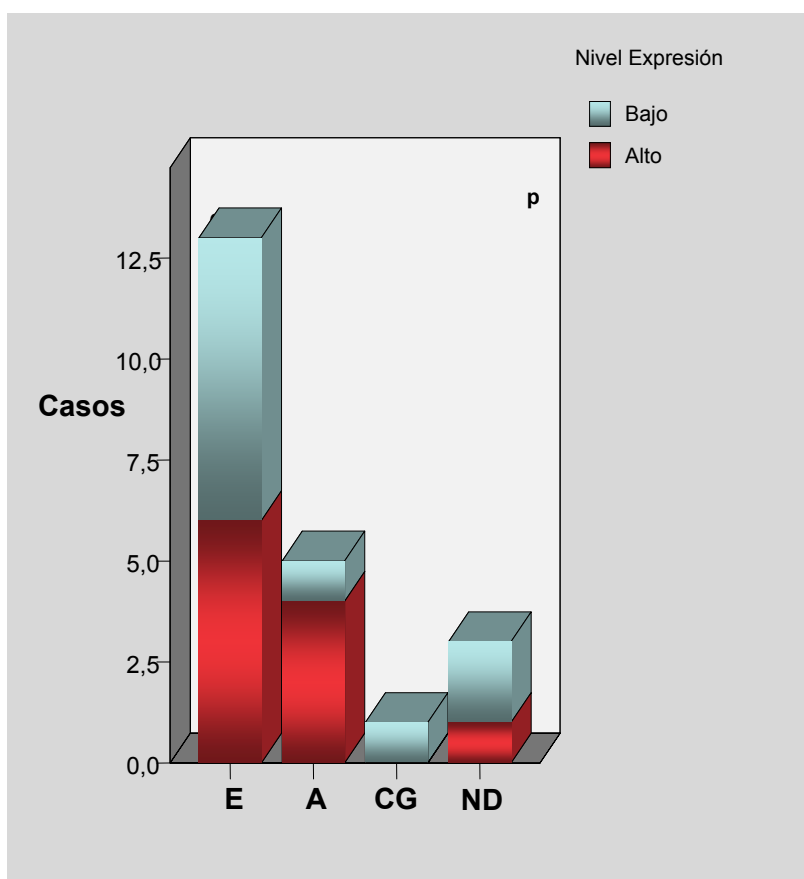
**Figura 35.** Expresión de mdrl1 en relación al hábito tabáquico.

No se encontró diferencias significativas en el nivel de expresión entre los pacientes con o sin pérdida de peso (Figura 36). De los 18 pacientes que no presentaban pérdida de peso en el momento del diagnóstico, 9 (50%) tenían niveles bajos y 9 (50%) niveles altos. De los 3 pacientes que habían perdido menos de 5 kilogramos, 1 paciente (33,3%) presentaba niveles bajos y 2 (66,7%), niveles altos. El paciente con pérdida de más de 5 kilogramos presentaba niveles bajos.



**Figura 36.** Expresión de mdr1 en relación a la pérdida de peso.

En cuanto a la histología, tampoco se encontró diferencias significativas entre la expresión de mdr1 y el subtipo patológico (Figura 37). En los casos de carcinoma epidermoide, 7 (53,8%) presentaron niveles bajos y 6 (46,2%) niveles altos. De los 5 pacientes con adenocarcinoma, 4 presentaron niveles altos (80%). El paciente con carcinoma de células grandes tenía niveles bajos (100%).



**Figura 37.** Expresión de mdrl en relación a la histología. E: epidermoide; A: adenocarcinoma; CG : carcinoma de células grandes; ND: no determinado.

No se ha encontrado relación entre la expresión de MDR1 y el estadio tumoral TNM. De los 12 pacientes con estadio IV, 7 (58,3%) presentaron niveles altos. Los 2 (100%) pacientes con estadio IIIB presentaron niveles bajos. De los 7 pacientes con estadio IIIA, 4 (57%) expresaron niveles bajos y 3 (43%) niveles altos. El paciente con estadio IB, obtuvo un nivel alto (Figura 38).

Tampoco hubo diferencias significativas entre los pacientes según las localizaciones metastásicas (Figura 39). Los 3 pacientes con metástasis cerebrales al diagnóstico (100%) presentaban niveles altos, sin significación estadística. De los 3 pacientes con metástasis en más de una localización (mayor carga tumoral), 2 tenían niveles bajos (66,2%). Los 6 pacientes con metástasis en una sola localización, presentaron en la misma proporción (3:3) niveles bajos y altos. De los pacientes no metastásicos (M0), 6 (60%) presentaron niveles bajos y 4 (40%) niveles altos.

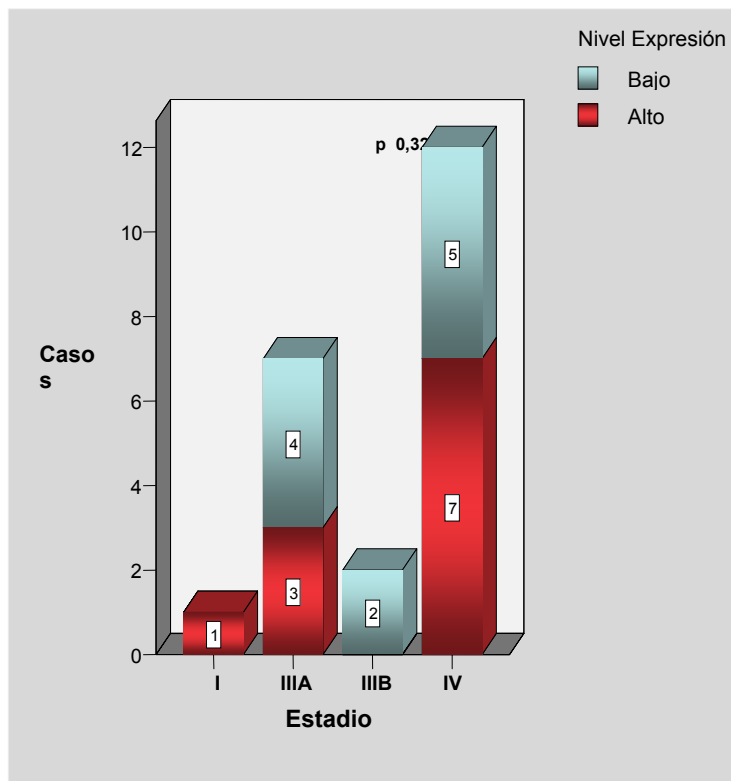


Figura 38. Expresión de mdr1 en relación al estadio TNM.

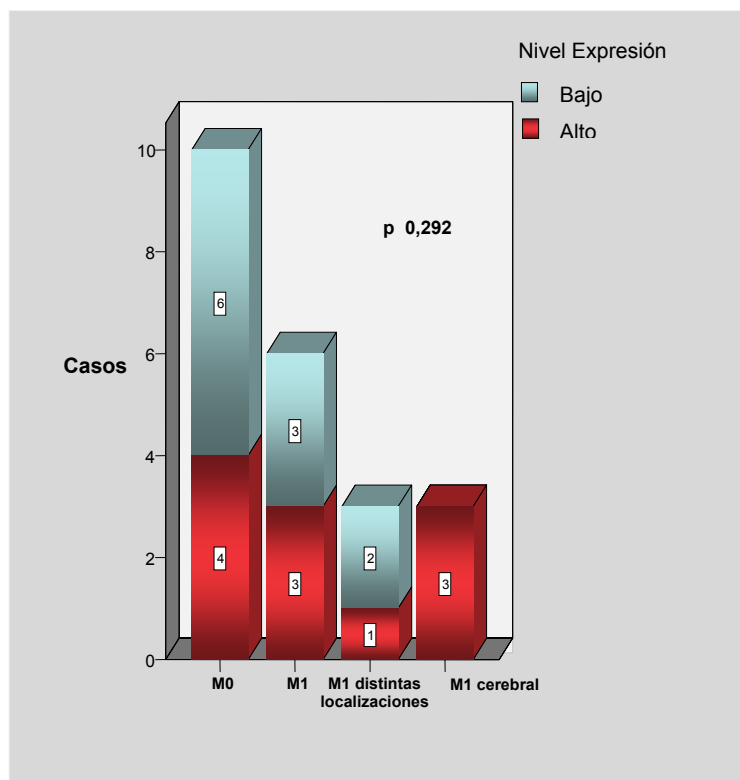


Figura 38. Expresión de mdr1 en relación a la localización metastásica.



# Discusión

El carcinoma de pulmón es la causa de muerte más frecuente por enfermedad neoplásica en los países occidentales. A pesar de todos los avances en el conocimiento de la biología del tumor, en los métodos de diagnóstico y protocolos de tratamiento, la supervivencia de esta enfermedad sigue siendo globalmente muy pobre. Los dos grupos fundamentales de carcinoma broncogénico, el carcinoma de pulmón de células pequeñas y el carcinoma de pulmón no células pequeñas, presentan diferentes comportamientos biológicos y respuestas al tratamiento. En ambos, el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente constituyen los factores aceptados clásicamente con mayor influencia pronóstica. Sin embargo, ninguno de ellos tiene capacidad suficiente para predecir la agresividad biológica del tumor, ni la respuesta al tratamiento. En este sentido, la identificación de diferentes *marcadores biológicos moleculares* constituye un amplio campo de investigación, que en un futuro inmediato permitirá determinar con más exactitud la evolución de los pacientes y seleccionar el tratamiento óptimo.

La reciente aplicación de nuevas tecnologías de biología molecular, especialmente el uso de *microarrays*, nos ha permitido pasar en poco tiempo de analizar los patrones de expresión de 1 o 2 genes a detectar simultáneamente el grado de expresión de miles de genes a la vez. Al aplicar estos métodos al estudio del cáncer de pulmón, se ha demostrado que el patrón de expresión de muchos de los genes relevantes en el desarrollo de la enfermedad es extraordinariamente complejo. No existe un patrón de expresión uniforme para una estirpe o subestirpe concreta de cáncer de pulmón o, dicho de otro modo, no existe un único gen o una única combinación de genes que esté consistentemente sobreexpresado o subexpresado en un fenotipo particular de cáncer (Ross y cols., 2002). Sin embargo, el procesamiento de esa ingente información mediante procedimientos estadísticos sofisticados (*clustering*) permite establecer subgrupos, según el perfil de expresión genética, que se correlacionan significativamente con la supervivencia. La perfección y el refinamiento de estas técnicas podrían contribuir a establecer nuevas clasificaciones del cáncer de pulmón con relevancia pronóstica y terapéutica (Beer y cols., 2002).

En muchos hospitales se determinan marcadores en suero en pacientes con cáncer de pulmón, pero las publicaciones más prestigiosas desaconsejan su uso por su escasa eficacia (Pfister y cols., 2003; Rivera y cols., 2003). En este tumor, a diferencia de otros como el cáncer de mama, donde *BRCA1*, *BRCA2* son indicativos de predisposición a la enfermedad o los receptores estrogénicos o el *HER2/neu* son de trascendencia pronóstica y terapéutica, no existe aún ningún marcador lo suficientemente útil para que se emplee de modo sistemático. Sin embargo la investigación es muy amplia en relación a: a) marcadores de susceptibilidad, como polimorfismos de enzimas relacionadas con la activación o eliminación de carcinógenos; b) de diagnóstico temprano, c) de pronóstico, imprescindibles para la toma de decisiones en subgrupos de pacientes y d) de predicción de la sensibilidad o resistencia del tumor frente a determinados fármacos, aspecto éste de evidente relevancia clínica y que está siendo objeto de intensa investigación en estos años.

*Es precisamente dentro de estos dos últimos campos donde se enmarca nuestro **Proyecto de Investigación** que tiene por objetivo avanzar sobre la utilidad real que poseen algunos genes de resistencia a drogas en la predicción de una posible respuesta al tratamiento y en el pronóstico de la enfermedad.* La posibilidad de ensayar con fármacos de uso habitual en clínica a concentraciones plasmáticas sobre sistemas experimentales in vitro y la capacidad de obtener patrones de expresión de genes de resistencia en el suero de pacientes afectos de CPCNP antes y después del tratamiento, nos ha permitido obtener unos resultados que abundan sobre los mecanismos reales de resistencia inducida por combinaciones de fármacos de uso clínico (como paclitaxel y carboplatino), el patrón de resistencia desarrollada en pacientes tratados con estos agentes y su utilidad como marcadores de cáncer de pulmón en la práctica clínica.

### **Limitación de la aplicación de marcadores tumorales en la evaluación del pronóstico y respuesta al tratamiento en cáncer de pulmón**

Las investigaciones dirigidas a determinar la capacidad pronóstica de múltiples marcadores moleculares es muy amplia incluyendo genes *K-ras*, *Bcl2*,

Her2/*neu*, gen EGF-R, p53, Rb, p16, p27, ciclinas, catepsina B, inhibidores titulares de metaloproteinasas, telomerasa, VEGF, fragmento 19 de citoqueratina (CYFRA 21-1), enolasa neuronal específica, etc.. Sin embargo, ninguno de ellos es de uso rutinario en la práctica clínica ya que factores como las diferencias metodológicas, la inclusión de un número relativamente bajo de enfermos, la insuficiente comparación de los factores recientemente descritos con los identificados en estudios previos y los resultados heterogéneos, hacen que estos factores sigan siendo considerados como “nuevos o prometedores” (Taneja y Sharma, 2004).

De hecho, no resulta fácil conocer el valor de cada marcador en concreto. En una revisión realizada por Brundage y cols. (2002) se indica que, a título ilustrativo y sin valor de “evidencia”, los marcadores asociados significativamente con la supervivencia fueron el estado en que se detectó p21, CYFRA 21-1, Ag-NOR, p185, Ki-67 VEGF y p53, aunque sin evidencias concluyentes. De igual forma, parece que se relaciona con un mayor riesgo de fallecimiento las siguientes situaciones: elevada cantidad de microvasos en pieza tumoral (Meert y cols., 2002), VEGF positivo (Delmotte y cols., 2002) CYFRA 21-1 elevada (Pujol y cols., 2004) y la sobreexpresión de C-erbB-2 (Meert y cols., 2003) que conduce a la acumulación de p185, y p53 anormal (Steels y cols., 2001). La mutación del oncogén K-*ras*, que da lugar al aumento de p21, se ha asociado también con una reducción de la supervivencia de los enfermos, pero los trabajos analizados resultaron excesivamente heterogéneos (Huncharek y cols., 1999).

Una de las características del cáncer, especialmente aplicable al cáncer de pulmón, que plantea difíciles retos a la hora de abordar su tratamiento es la gran heterogeneidad, no sólo en cuanto a la expresión clínica, la velocidad de crecimiento o el potencial metastásico, sino en cuanto a su resistencia o sensibilidad a la medicación aplicada. La heterogeneidad se da no sólo entre tumores de igual estirpe en distintos pacientes, sino incluso en un mismo tumor de un mismo paciente, de modo que cuando se diagnostica, aun en estadio temprano, existe una gran diversidad de poblaciones celulares con características diferentes (Frei, 1987). En la práctica, la tasa de respuestas objetivas en este tipo de cáncer, la mayoría remisiones parciales, se puede

alcanzar hoy en el 30-40% de los casos y, aunque circunstancias clínicas como el estado general del paciente, la co-morbilidad, etc. nos ayudan a seleccionar a los candidatos a recibir tratamiento con quimioterapia o radioterapia, es claro que todavía desconocemos en gran medida qué rasgos del tumor nos pueden precisar qué pacientes serán beneficiarios de tal o cual tratamiento.

Son muchos los genes propuestos para valorar la respuesta al tratamiento y por tanto el pronóstico del cáncer de pulmón. Entre otros genes de probable importancia en la respuesta al tratamiento se encuentran los que controlan la capacidad de reparación del ADN. Así, la sobreexpresión del oncogén p53 se ha asociado a una pobre respuesta frente a la quimioterapia basada en cisplatino, en pacientes con enfermedad avanzada (Gregory, 2003). El mismo significado adverso de p53 se observó también en una serie de pacientes con estadio III tratados con vinorelbina y radioterapia (Brooks, 2003). Por otro lado, en trabajadores expuestos a cloruro de vinilo se ha observado que algunos polimorfismos comunes del gen *ERCC1* (gen de reparación-escisión, o *excision repair cross-complementing-1*) son causantes de la susceptibilidad al daño genético inducido por sustancias químicas (Yangliang, 2003). En el cáncer de pulmón la expresión del *ERCC1* parece implicar, por un lado, un buen pronóstico y, por otro, una probable resistencia al tratamiento con cisplatino; a su vez, aquellos con baja expresión tendrían peor pronóstico, pero mayor sensibilidad a dicho fármaco, lo que podría ser útil para seleccionar a pacientes candidatos a obtener mayores beneficios con tratamiento adyuvante (Lord, 2002; Rossell, 2004). Asimismo, la expresión de BRCA1 se ha asociado a un peor pronóstico y sensibilidad a taxanos, mientras que niveles bajos se relacionan con supervivencias mayores y sensibilidad a platino (Taron y cols., 2004).

Al igual que en el cáncer de mama, la amplificación o sobreexpresión del receptor de membrana HER-2/*neu*, o C-erb-2, se asocia a una conducta más agresiva y peor pronóstico: un estudio de pacientes sometidos a resección que analizaba factores predictores de supervivencia demostró que la sobreexpresión de este marcador mantenía un valor pronóstico independiente en un análisis multivariante que incluía el sexo, la estirpe, el estadio TNM y el tipo de cirugía (Selvagi, 2002). Su posible papel en el cáncer de pulmón ha

sido analizado (Langer, 2004; Gatzemeier, 2004), aunque en ninguno observó ventaja en los tratados con la medicación de prueba, frente a controles. No obstante, se determinó la necesidad de cuantificar los marcadores de modo más preciso, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa previa transcriptasa inversa, y no simplemente mediante inmunohistoquímica de la pieza tumoral.

Aunque son muchos las familias de genes que están siendo investigadas como posibles marcadores que ayuden a la determinación del pronóstico en cáncer de pulmón, uno de los campos en los que se investiga más intensamente es sobre genes que son la base de los mecanismos celulares causantes de la resistencia a citostáticos. Un buen ejemplo es la P-glicoproteína codificada por la familia de genes de MDR que expulsa los fármacos fuera de la célula mediante un sistema transportador dependiente del adenosintrifosfato (Bradshaw, 1998).

### **Citotóxicos de uso habitual en el tratamiento del CPCNP y fenómeno de resistencia. Estudios experimentales.**

Se conoce ampliamente que el gen de resistencia MDR1, uno de los genes de resistencia más estudiados, se encuentra relacionado con la ineficacia en la utilización de drogas antineoplásicas en una gran cantidad de tumores. Entre éstas drogas se encuentran muchas de las que son utilizadas habitualmente en el tratamiento de CPCNP incluyendo el paclitaxel y el carboplatino (Ding, 2001). Hoy sabemos que son muchos más los genes de resistencia que pueden estar implicados en ese fracaso terapéutico incluyendo familia MRP, LCP y BCRP.

Previo a los ensayos clínicos, han sido los estudios experimentales la base para demostrar la relación entre fármaco y sobreexpresión de genes relacionados con la resistencia. Sin embargo, dichos estudios utilizan dosis en un rango tan amplio que es difícil saber cuales son los niveles que realmente dan lugar a la aparición de la modificación génica y, lo que es más importante, si esas concentraciones poseen correlación con los niveles que las drogas que se alcanzan en sangre una vez administradas o en los tejidos afectados de la

patología tumoral. Además, es difícil determinar en base a los estudios realizados, la capacidad que los citados fármacos poseen sobre la proliferación del tumor sin conocer cual es la concentración a la que se encuentra expuesta la masa tumoral.

En este sentido, y para dos de los agentes más frecuentemente utilizados en el tratamiento de CPCNP como son el paclitaxel y carboplatino y que han sido objeto de nuestra investigación, las concentraciones utilizadas en ensayos experimentales son tan variadas que como hemos comentado hacen difícil obtener conclusiones generales. En general, los estudios con los dos agentes utilizan un rango de dosis basado en experiencias previas que demuestran la inducción de cambios biológicos significativos sin provocar efectos tóxicos (Huizing, 1993; Engblom, 1999; Pathak 2002). La mayoría de los estudios en cultivos celulares con estos u otros citotóxicos toman como referencia la dosis a la que estos son capaces de inhibir el 50% de la población celular presente. Aunque este diseño experimental permite conocer los efectos del fármaco sobre las células tumorales e investigar sobre su posible mecanismo de acción, no deja de estar lejos de lo que realmente sucede en el organismo o sea de la concentración de fármaco que realmente es capaz de llegar al tejido tumoral que se encuentra incluido en un tejido normal y al que el aporte de fármaco se produce después de su metabolización y vehiculización a través de la sangre. En este sentido el reciente estudio de Marsh y cols (2008) en relación a la farmacocinética de paclitaxel basado en más de 20 estudios clínicos permite acercarse a la concentración máxima que este agente alcanza en plasma en función a la dosis administrada al paciente, lo que hace posible conocer la concentración de fármaco con la que en realidad entra en contacto la célula tumoral.

Basándonos en estos datos y en función de las dosis terapéuticas que son aplicadas a los pacientes en el Hospital Universitario Virgen de la Nieves de Granada, nosotros hemos diseñado las experiencias in vitro con concentraciones plasmáticas de fármaco que nos permitan determinar el efecto real sobre diferentes cultivos de células tumorales no sólo en cuanto a su capacidad de afectar la proliferación sino en relación a la capacidad de

sobreexpresar genes a concentraciones y tiempos que se acercan a los obtenidos durante el tratamiento clínico de los pacientes.

En general hemos observado que las dosis plasmáticas de carboplatino provocaron una reducción en la proliferación menor que las del paclitaxel que se muestra mucho más efectivo tanto en las líneas de cáncer de pulmón como en las no pulmonares. Además, los efectos tanto del paclitaxel como del carboplatino en las líneas A-549, A-427 y NODO fueron mayores que en las derivadas de otros tejidos como testículo, aparato digestivo y mama.

Por otra parte, el incremento o la reducción en la concentración de fármacos que realizamos ensayando dosis mayores y menores a la concentración plasmática de ambos fármacos, tuvo un efecto muy variable en la proliferación celular. En general, y dentro de la variabilidad existente, los incrementos de la concentración (al menos los usados en los ensayos) no provocan cambios significativos en la inhibición de la proliferación celular y si en algún caso fueron detectados, aún siendo significativos, estos no son extremadamente importantes. Sin embargo, en algunos casos pudimos observar como la reducción de la concentración de paclitaxel y de carboplatino en los cultivos celulares si modificaron significativamente la inhibición de la proliferación que fue evidentemente menor. Este hecho fue especialmente importante en las líneas derivadas de CPCNP. Autores como Georgiadis y cols. (1997) analizan la inhibición de la proliferación provocada por rangos de paclitaxel comprendidos entre 0.01 microM y 10 microM. El estudio en más de 28 líneas de cáncer de pulmón confirma que el tratamiento con paclitaxel induce una reducción en la proliferación que esta relacionada con la concentración usada de paclitaxel. Sin embargo, dicha reducción fue similar cuando se utilizaron dosis entre 0.01microM y 10 microM para diferentes líneas. Especialmente relevante es el caso de la línea NCI-H526, línea también derivada de de cáncer de pulmón, que no presentó prácticamente modificaciones en estos rangos. El análisis de la IC50 determinó que la media detectada para las 28 líneas fue de 32microM a las 3h, 23 microM a las 24 h y 0.38 microM a las 120 horas.

Experiencias sobre otras líneas de este tipo de cáncer como H520 determinan una inhibición de proliferación (determinado el % de citotoxicidad )



del 87% para el paclitaxel y del 22% para el carboplatino (Pathak y cols., 2002) que no se modificaron tampoco dentro de un rango de 100 microM. En otros tipos de tumores como el cáncer de ovario las experiencias se realizan con concentraciones algo menores de paclitaxel como por ejemplo 5 microM (Jun Ahn, 2004) y los resultados son contradictorios. Es posible que un tiempo más prolongado de exposición pueda ser un factor decisivo al determinar el efecto del fármaco especialmente en cuanto a la tasa de proliferación celular. Autores como Georgiadis y cols. (1997) defienden que la citotoxicidad del paclitaxel incrementa en relación a la duración de la exposición pero es independiente de su concentración. Nuestras experiencias se han limitado a determinar dicha proliferación hasta las 72 horas en cultivo si bien es cierto que en todas las líneas se realizó un seguimiento más prolongado. No obstante, este seguimiento fue especialmente dedicado a establecer la supervivencia de los núcleos de células que aparecían en los cultivos, que presentaban un tiempo de duplicación parecido al de las células parentales, que se replicaban tanto en presencia de fármacos como en ausencia de estos y que nos sugerían que eran células que habían desarrollado resistencia a paclitaxel y carboplatino por algún mecanismo que posteriormente pasamos a estudiar. Sin embargo, otros autores aportan datos sobre experiencias mucho más prolongadas en las que por ejemplo, el paclitaxel es usado durante 120 horas. Sorprende el hecho de que estos autores determinan un cambio en la IC50 de las células tumorales, que llegó a ser de 0.0027 mM., muy por debajo de la concentración que se obtiene en la sangre después de un tratamiento de 175-200 mg/m<sup>2</sup> de uso habitual en clínica.

Los estudios realizados con carboplatino a nivel experimental y teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas del agente son extremadamente escasos. Nuestros resultados demuestran que tanto en las líneas de cáncer de pulmón como en las no pulmonares, el carboplatino provoca una reducción en la tasa proliferación celular menor que la encontrada con paclitaxel. Estudios con carboplatino a concentraciones terapéuticas en cultivos de células de cáncer de ovario (OCC1-SEAP-12) demuestran una reducción del 35% y el 54% tras 48 h y 72 h en cultivo (Westfall, 2005). Estos datos son mayores que los encontrados con este agente en las líneas de seminoma y cáncer gástrico

aunque debemos tener en cuenta la diferente histología de los tumores testados. Otros estudios, realizados con agentes de la misma familia como es el caso del cisplatino frente células de cáncer de pulmón (Zhang, 2003), permitieron obtener dos conclusiones: por una parte, los efectos del cisplatino sobre la línea A-549 se muestra dosis-dependiente; así, existe un notable diferencia en la reducción de la proliferación a concentraciones de 16 y 96 micro M a lo largo del tiempo (hasta 96h). En segundo lugar, el estudio mide la acción del cisplatino sobre A-549 a lo largo del tiempo pudiéndose observar que los cultivos con cisplatino a 64 microM tiene una ligera elevación de la proliferación celular a las 12 horas, a las 24 se mantiene su población inicial mientras que a las 48 horas hay otra pequeña elevación (Zhang y cols., 2003). En nuestro caso, con el carboplatino sólo se observa una disminución de la proliferación si bien es cierto que esta es más o menos marcada dependiendo de la línea celular y que se hace más notable a diferentes tiempos de exposición. Como dice Pathak y cols. (2002), en los estudios realizados en carcinoma escamoso de pulmón, los agentes paclitaxel y carboplatino poseen una incidencia muy diferente en la supervivencia de las células tumorales. Concentraciones de 0.05 micro M a 1.1 microM de paclitaxel provocan una citotoxicidad del 83% en un tiempo de exposición de 24 horas, mientras que la del carboplatino (entre 0.5 y 1.5 microM/ml) provoca una citotoxicidad del 22%.

Por último, cuando las células fueron sometidas a una asociación de ambos fármacos pudimos observar un aumento significativo de la inhibición en la proliferación que fue fundamentalmente evidenciado a las 24 y 48 horas no siendo en muchos casos significativo a las 72 horas. A diferencia de lo que ocurrió en las líneas de cáncer de pulmón, la asociación de ambos fármacos en las líneas de seminoma y cáncer gástrico no provocó un aumento significativo de la inhibición de la proliferación mientras que en la línea MCF-7 solo fue significativo las 24 horas.

Los estudios morfológicos realizados en las líneas de CPCNP tras el tratamiento con paclitaxel, carboplatino y la asociación de ambos mostraron dos hechos fundamentales en relación a nuestro estudio; en primer lugar, la presencia de núcleos celulares que crecieron en presencia del fármaco y en segundo lugar cambios morfológicos que apuntaban hacia un proceso

apoptótico destacando la aparición de condensaciones, fragmentación y ruptura celular en tiempos de actuación de fármaco extremadamente cortos.

Nuestras experiencias evidenciaron que los agentes testados inducen notables cambios morfológicos en todas las líneas celulares tanto de cáncer de pulmón como de otros tejidos además de la típica aparición de zonas despobladas de células por el efecto citotóxico. Quizas el hecho más destacable, fue la presencia de núcleos celulares con morfología poco alterada y que, como se comentó en Resultados, en un seguimiento más prolongado durante semanas tuvieron la capacidad de crecer formando una monocapa y con un tiempo de replicación parecido al de las líneas basales. Este fenómeno ha sido observado por otros autores en otras líneas (Prados y cols., 2006). No obstante, no sabemos, como en el caso de lo que ocurre in vivo, si es indicativo de la presencia de células que ya expresaban genes relacionados con la resistencia a droga, lo que les permite seleccionarse ante la presión del fármaco, o son células que ante la presión de fármaco poseen la capacidad de sobreexpresar de novo dichos genes, lo que les permite sobrevivir en el medio de cultivo (Sörenson y cols., 2001). En cualquier caso, lo que se pone de manifiesto es que el contacto de estas líneas con paclitaxel y carboplatino es capaz de modificar o seleccionar algunos grupos celulares que a diferencia de la mayor parte del cultivo son capaces de seguir proliferando.

Por otra parte y como hemos comentado, los cambios morfológicos fueron indicativos de apoptosis. Para demostrar la presencia de este fenómeno en nuestras células se llevó a cabo un estudio mediante anexina y IP que fue valorado por FACS con el objeto no tanto de demostrar la apoptosis, ya descrita en otros artículo que después comentaremos, sino para determinar qué apoptosis real era capaz de inducir la concentración plasmática del fármaco cuando se pone en contacto con la células tumoral de forma muy similar a lo que ocurre in vivo. En general y tal y como se vio en resultados, el carboplatino provoca una tasa de apoptosis mayor que el paclitaxel siendo muy similar lo que ocurre en la línea A-549 y A-427. Estudios con otras concentraciones (no mostrados) determinan que se pueden obtener niveles de apoptosis parecidos a estos con dosis significativamente menores de fármaco. Las modulaciones en este fenómeno en base a la concentración del fármaco

en general y del paclitaxel en particular, ya fueron descritas y podrían estar relacionada con la inducción a estas concentraciones de NF-kB un factor de supervivencia celular que puede inhibir el desarrollo de este fenómeno y la pérdida de respuesta del paclitaxel. No obstante, si se pudo comprobar como los efectos de ambos fármacos por separado o bien en conjunto provocan una apoptosis significativamente mayor a lo observado por otros autores como Pànak y cols. (2002) quien ensaya sobre la línea de cáncer de pulmón H520 con paclitaxel. Esto es indicativo de que los diferentes resultados obtenidos dependen no sólo de las concentraciones ensayadas sino de las líneas celulares utilizadas.

Por otra parte, es significativo el hecho de que ambos agentes sean incapaces de originar unos niveles de apoptosis parecidos o mayores en la línea de CPCNP de NODO que deriva de una metástasis que en las encontradas para A549 y A-427. En relación a este hecho, Wang y cols. (2003) estudian como la administración de paclitaxel in vivo es capaz de provocar una reducción significativa de la producción de metástasis aunque el estudio se realiza en melanoma. Este autor encuentra una reducción de un 66% en la producción de metástasis en ratones con melanoma inducido a partir de la línea B16BL6 derivada de un melanoma murino. El principal mecanismo es la inducción de un fenómeno de apoptosis en las células que se caracterizaron por presentar el típico patrón nuclear. Los estudios realizados mediante TUNEL demostraron un porcentaje de 35.6% de células con fenómenos de apoptosis en contraste con el 17.6% que presentó el grupo control, lo que habla del importante efecto de este agente en las células metastásicas, en contra de lo que aportan nuestros datos, si bien es cierto que las líneas son de diferente origen histológico.

En cuanto a la actividad apoptótica del carboplatino detectada en nuestro estudio, no pudimos ver variación significativa en relación a las diferentes dosis utilizadas siendo por tanto la proporción de células apoptóticas similar con las concentraciones plasmáticas y superiores e inferiores a éstas. Sin embargo es significativo el hecho de que el ensayo para comprobar la posible potenciación de los efectos apoptóticos de paclitaxel y carboplatino demostró que, al menos a las 48 horas de tratamiento, la células alcanzaron unas tasas de apoptosis

de un 63.22%. Como en los casos anteriores las dosis de los fármacos no parecen influir en el desarrollo de este fenómeno. Nuestros resultados son apoyados por los de Pathak y cols. (2002) quienes observan en la línea de NSCLC H520, derivada de un carcinoma escamoso, que la asociación de carboplatino y paclitaxel provoca una apoptosis considerable situada en un  $40.3\% \pm 3.1$ , que supone un incremento en relación a la capacidad de inducir apoptosis de los dos fármacos independientes. No obstante, debemos tener en cuenta que este estudio se realiza con concentraciones de 0.05 microM para el paclitaxel y de 0,5 microgramos/ml para el carboplatino y que el tiempo de exposición es de 24 horas. Estas dosis han demostrado su efectividad in vitro pero son menores que las concentraciones plasmáticas alcanzadas in vivo (Huizing y cols., 1993; Englobm y cols., 1999). Otros trabajos apoyan la idea de que el principal efecto del paclitaxel es la inducción de apoptosis en las células tumorales. Sin embargo los rangos tan variados de dosis utilizadas y los modelos tan diversos y distintos en los que se emplean, hacen difícil la comparación. Así, autores como Das y cols. (2001) apoyan nuestros resultados en cuanto a la inducción de apoptosis (26%) si bien es cierto que aunque se emplea la línea A-549, las dosis son tan bajas como 0.023microM. Sin embargo, según estos autores por debajo de estas concentraciones la apoptosis fue mínima alcanzando niveles de tan sólo un 5% (0.002microM). Algunos estudios en otras líneas de cáncer de pulmón (como la H1299) parecen confirmar que para la inducción de apoptosis no sólo es importante el tipo celular sino los niveles de P-53. En este caso la respuesta parece menor en las líneas como H1299 que son p53 (-/-). Como dice Torres y cols. (1998) la respuesta a paclitaxel depende del tipo de cáncer pero también de la carga genética que tenga la células.

El fenómeno apoptótico inducido por paclitaxel ha sido analizado en otras líneas que confirman su importancia en la acción de este fármaco. En cáncer de ovario (SKOV3) dicho proceso es mediado, en contra de lo que se pensaba, por AIF (factor inductor de apoptosis) (Ahn y cols., 2004.) Para realizar este estudio los autores inducen sólo durante 24 horas la línea SKOV3 con paclitaxel a 5 microM encontrando mediante el estudio de anexina/IP un aumento de las células en apoptosis temprana (26%) de 5 veces y de las

células en apoptosis tardía (“secondary necrotics”) de 2 veces (5.1%) comparadas con el control (2.24% y 2.34% respectivamente).

En la línea HL-60 de leucemia mieloide aguda y en células de cáncer gástrico, el paclitaxel parece inducir apoptosis mediada por la activación de la caspasa 3 (Weigel y cols., 2000 en la de Ahn y cols). Sin embargo, en células de cáncer de ovario esto no ocurre (Ofir y cols., 2002). Esto refuerza la idea de que, como dice Blagosklonny y cols. (2003), el paclitaxel puede tener diferentes vías de actuación dependiendo del tipo celular. Podría ser como ya se apuntó anteriormente que el paclitaxel a bajas concentraciones (0.005 a 0.05 microM) estabilice la mitosis y bloquee la división induciendo apoptosis mientras que a concentraciones mayores (5-50 microM) incremente la polimerización de los paquetes de microtúbulos (“bundle”) bloqueando la entrada en la fase S. La inhibición de esta fase bloquea la proliferación e induce la muerte celular (Yeung y cols., 1999).

Como se ha comentado previamente, nuestros resultados indican una potenciación de la apoptosis cuando existe una acción combinada de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas sobre todas las líneas celulares, especialmente las de cáncer de pulmón. Algunos estudios indican que la asociación de paclitaxel a otros agentes antitumorales provoca este mismo efecto. En las células H520 ambos agentes inducen un 43% de apoptosis. Curiosamente, y este hecho no ha sido comprobado en nuestras células este efecto se incrementa cuando las células son tratadas primero con paclitaxel y después de retirar este se aplica un tratamiento de carboplatino (54%) (Pathjak y cols., 2002) posiblemente por la lesión que previamente provoca el paclitaxel. Además en este trabajo, se explora la posibilidad de aumentar dicha apoptosis mediante el uso en el cultivo de la mezcla de tres antioxidantes como son vitamina C, E y beta caroteno (la apoptosis llega al 89%). Curiosamente el paclitaxel provoca una mayor citotoxicidad que el carboplatino. Esto explicaría porque al usarlos a la vez la apoptosis provocada por el carbopaltino en 24 horas puede quedar solapada por los efectos del paclitaxel.

Este efecto asociativo o potenciador no es exclusivo del paclitaxel y del carboplatino para células de cáncer de pulmón. Así, en la línea A-549 la asociación de pemetrexed y gemcitabina produce un paso de una apoptosis

basal del 7% a un 22%. En la línea Calu los resultados fueron similares (Giovanetti y cols., 2005). Otro ejemplo del aumento de la apoptosis en la asociación de fármacos se da en el caso del tratamiento de la línea A-549 y Calu6 con topotecan y gemcitabina. Topotecan induce un porcentaje de apoptosis de 7.7 y 6.1 respectivamente en las líneas. Gemcitabina del 13.4 y 8.6. Sin embargo cuando se usan asociados el porcentaje fue del 34 y 27% respectivamente. En este caso fue la activación de las caspasas las que parecen mediar el efecto (Giovannetti 2005).

En otros estudios el paclitaxel se ha combinado con la vinorelbina para el tratamiento de diferentes tipos de tumores como melanoma, leucemia y cáncer de mama, pero su mecanismo de sinergismo no se conoce (Jung, 2004). Para estos autores el paclitaxel por encima de 1 microM inicia un proceso de apoptosis en la que interviene c-junc y bcl-2. Uno de los mecanismos por los que actúa es mediante la disrupción de los microtubúlos. Cuando el paclitaxel a dosis terapéuticas se asocia a la vinorelbina existe un aumento en la producción de apoptosis aunque también es cierto que se acompaña de una mayor toxicidad como se ha podido observar en al línea A-549. Serán necesarios más estudios para determinar el mecanismo de asociación que existe entre estos dos fármacos.

Uno de los objetivos de nuestro Proyecto de investigación ha sido determinar cual es el patrón de resistencia real que desarrollan las líneas tumorales de pulmón y de otros tejidos ante la exposición a las concentraciones plasmáticas de agentes farmacológicos que se obtienen en el suero de los pacientes y que son las más próximas a las que están sometidas los tejidos con la masa tumoral. Para ello hemos utilizado en primer lugar cultivos de líneas en donde se han ensayado dichas dosis plasmáticas, hemos determinado la expresión de diferentes genes de resistencia y hemos analizado la modulación en base a un estudio densitométrico.

La eficacia de la densitometría para la valoración de la modulación en la expresión de genes en general y de resistencia en particular está ampliamente demostrada dada la perfecta correlación entre los niveles de ARNm y los niveles de proteínas. En este sentido uno de los trabajos más prestigiosos y más extensos es el realizado por Young y cols. (2001) en relación a la

resistencia inducida en 30 líneas de cáncer de pulmón distintas. La exposición de estas líneas durante 48 horas a diferentes fármacos y la medición mediante PCR y densitometría de los niveles de expresión de genes MRP soportó la hipótesis de la validez de esta técnica para predecir los niveles de proteína generada, los cuales fueron valorados mediante Western blot mediante sueros policlonales de estas proteínas.

En base a esta tecnología y como datos más relevantes de nuestra investigación cabe destacar que a nivel experimental el paclitaxel utilizado a las concentraciones plasmáticas máximas es un potente inductor de la expresión de MDR1 en todas las líneas de cáncer de pulmón. Esta inducción puede detectarse en un tiempo muy breve (3h). En general la expresión observada no es muy elevada aunque se mantiene con modificaciones que comentaremos más tarde hasta al menos las 48 h, tiempo hasta el que se han analizado en nuestras experiencias. Los estudios realizados mediante PCR demostraron que otros genes como MRP3, LRP y BCRP no se sobreexpresan al menos con estas concentraciones y en tiempos tan cortos como los observados. Además, su efecto sobre MDR1 parece no ser tejido dependiente ya que al menos en las líneas derivadas de cáncer de mama, cáncer gástrico y seminoma el agente también induce la expresión de este gen.

Por otra parte, la utilización de carboplatino a concentraciones próximas a las plasmáticas es capaz de inducir fundamentalmente la expresión de MRP3. Esta expresión también aparece en tiempos muy cortos (3h) y se mantiene al menos hasta las 48 h. El carboplatino no aumenta la expresión de MDR1, LRP o BCRP. Al igual que el paclitaxel, el carboplatino ejerce un efecto de inductor de la expresión de MRP3 también en otros tejidos tal y como pudimos observar en las líneas que no procedían de cáncer de pulmón. Estudios en líneas de carcinoma de pulmón escamoso establecido antes y después de la administración de derivados del platino (cisplatino) han demostrado la relación de estos agentes con la resistencia mediada por MRP. Así, en la línea EBC-2/R que había sido expuesta in vivo a dosis terapéuticas de cisplatino se observó un aumento significativo de la expresión de MRP3 que estuvo relacionado con la disminución en la concentración intracelular de estos agentes.



Por último, la asociación de paclitaxel y carboplatino a concentraciones plasmáticas parece potenciar la aparición de resistencia por MDR1 o MRP 3 apareciendo mayores niveles de expresión de ambos genes. Especialmente relevantes son los datos obtenidos en la línea de CPCNP derivada de un nódulo metastático, en la que mientras que los niveles de MDR1 inducidos por paclitaxel fueron parecidos a los de las líneas derivadas de un tumor primario, la asociación de ambos agentes paclitaxel y carboplatino dió lugar a sobreexpresiones que fueron del orden de 10 veces mayores que cuando se utilizó el agente sólo.

Nuestros resultados apoyan a los de Yoshida y cols. (2001) quienes ya apuntaban con sus experiencias a MDR y MRP como dos de los más importantes mecanismos de resistencia en cáncer de pulmón aunque los estudios de estos autores se hicieron con adriamicina. De hecho, la línea PC14 tratada con adriamicina durante 48 horas presentó una sobreexpresión significativa de MDR1 y MRP5 mientras que los valores de MRP1 MRP2 y SMRP no se modificaron e incluso los niveles de LRP disminuyeron. Similares resultados se encontraron con la línea resistente PC14-CDDP inducida a la resistencia mediante cisplatino.

Por otra parte, la generación de resistencia mediada por MDR1 y MRP3 e inducida por los agentes de uso habitual en el tratamiento de cáncer de pulmón, no es una resistencia específica de este tejido. Los análisis de las líneas derivadas de cáncer de mama, seminoma y cáncer gástrico, demostraron, hasta donde se pudo extender el estudio, un patrón de resistencia en todo similar al encontrado en las células de cáncer de pulmón lo que sugiere un mecanismo de desarrollo de resistencia similar.

Uno de los datos más interesantes en cuanto al desarrollo de resistencia de las líneas fue la observación de que la sobreexpresión tanto de MDR1 como de MRP3 se produce en tiempos muy cortos tras el contacto de las células tumorales con los agentes farmacológicos. Diferentes estudios encuentran patrones similares de inducción de resistencia e incluso aparición de resistencia en exposiciones aún más cortas. Así, en líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, H82, tratadas con dosis bajas de epirrubicina y de paclitaxel (2.5microM y 13 nM) durante tan sólo una hora se incrementan

los niveles de expresión de MRP1 hasta 4.5 veces (Su y cols., 1998). Por otra parte, el tratamiento durante 24 horas de HL60 y K562 de leucemia con TPA induce un aumento en la expresión de LRP.

Aunque nuestro estudio se centra en la concentración que el paclitaxel y el carboplatino alcanzan en sangre, algunos otros estudios han intentado determinar que concentración puede ser relevante para el desarrollo de resistencia al menos para la inducción de unos niveles mínimos de expresión. Así, otros estudios han determinado que la línea A-549 expuesta a paclitaxel muestra expresión de *mdr1* a partir de un cultivo con dosis de 24nM de paclitaxel, mientras que líneas expuestas a concentraciones menores 12nM no presentaron expresión de dicho gen. No obstante, debemos tener en cuenta que estos estudios están diseñados para generar líneas resistentes y por tanto que estas líneas han sido expuestas durante un periodo muy largo de tiempo al fármaco (Kavallaris y cols., 1997). Estos mismos autores demuestran que las líneas de pulmón desarrolladas con resistencia a paclitaxel presentan un amplio rango de *cross-resistencia* que en el caso de la línea A-549 fue taxotere, vinblastina, colchicina, adriamicina y bleomicina lo que habla de la posibilidad de que el contacto con un fármaco provoque el fracaso no sólo de éste, sino de otros o de la combinación de varios de ellos. Por otra parte, la típica alteración sin sobreexpresión de las mismas al contrario de lo que ocurre, por ejemplo, en células de cáncer de ovario sometidas al mismo tipo de tratamiento indica la distinta repercusión que un agente antitumoral puede tener en diferentes tejidos.

Nuestros resultados han determinado que a nivel basal la línea A-549 se comporta como una línea MDR1 negativa. Sin embargo la determinación de MRP demostró que esta línea presenta expresión de *mrp3* confirmando lo encontrado por otros autores como Young y cols. (2001) que detecta la presencia de MRP 3 en A-549. Por el contrario MCF7 fue una línea *mdr1/mrp* negativa aunque ha sido descrita por algunos autores como MDR positiva (Moretti y cols., 1998) posiblemente por tratarse de variedades distintas como son la europea y americana. En cualquier caso, tanto en una como en otra se pudo demostrar, en relación a *mrp*, que el carboplatino a concentraciones plasmáticas tiene predilección por inducir la expresión de esta familia de genes

y en concreto de MRP3, cosa que no hizo en ningún caso el paclitaxel. Esta droga tampoco produjo un incremento de los niveles de LRP ni de BCRP. Cuando se estudiaron los tiempos de la inducción con carboplatino se pudo observar un ligero aumento de expresión de MRP3 a partir de las 3 horas de exposición que se mantuvo a lo largo del tiempo.

Como hemos dicho previamente, las líneas no derivadas de cáncer de pulmón presentaron un patrón de resistencia frente a los fármacos analizado similar a las pulmonares, predominando la aparición de MDR1 con paclitaxel y de MRP3 con carboplatino. De hecho otras líneas de cáncer de pulmón como SCLC1 establecida a partir de una exposición intermitente de las células a cisplatino, no muestra un aumento de expresión de MRP 3 y sin embargo los estudios mediante PCR detectaron un aumento en los niveles de MRP4 que explicarían su resistencia no solo a cisplatino sino a otros agentes. Esto apoyaría la tesis de Savaraj y cols. (2003) de que la resistencia a los derivados del platino puede ser multifactorial aunque MRP 2, 5 y 6 parecen no estar relacionados con este fenómeno.

### **Estudio de la modulación en la expresión de MDR1 en sangre periférica de pacientes con CPCNP.**

La obtención consecutiva de muestras de tumor en pacientes con CPCNP, y en general en pacientes con cáncer, es muy difícil. Los pacientes tendrían que ser sometidos a pruebas invasivas a lo largo de su proceso, lo cual no es ético en enfermos sometidos a tratamientos que en muchos casos intentan aumentar calidad de vida y supervivencia, pero en los que no es posible la curación.

De ahí, la importancia de realizar estudios en tejidos accesibles, como es la sangre.

En general, los estudios de marcadores biomoleculares en sangre periférica son escasos, pero cada vez más emergentes, ya que se podría realizar un análisis continuado, a lo largo de todo el proceso de la enfermedad tumoral.

De hecho, en el último año se han publicado distintas investigaciones sobre la determinación en sangre de diferentes marcadores, si bien los resultados no son aplicables a la práctica clínica.

Sirera y cols. (2008) han estudiado el estado de p16 en 67 muestras de sangre periférica de pacientes con CPCNP avanzado, sin encontrar relación con tiempo hasta progresión o supervivencia.

Tiseo y cols. (2008) han analizado el nivel de enolasa neuronal específica en la sangre de 169 pacientes con CPCNP, pero tampoco han encontrado relación del nivel de expresión con el pronóstico.

También se ha intentado correlacionar los niveles circulantes de factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF) con el curso de la enfermedad, sin poder concluir que constituya un factor pronóstico (Chakra y cols., 2008).

Prácticamente no se han realizado estudios de la expresión de genes *mdr* en la sangre periférica de pacientes con CPCNP. Encontramos los trabajos de Oguri y cols. En 1998 determinaron la expresión de LRP mediante RT-PCR en la sangre periférica de 8 pacientes con CP antes y después de la administración de quimioterapia. No encontraron variación de expresión. Esta investigación se complementa con estudio en tejido, puesto que también se determinaron los niveles de LRP antes y después de la administración de platino en cuarenta muestras tumorales de CP, cuarenta muestras de tejido pulmonar sano y dos líneas celulares. Tampoco se encontró variación de la expresión.

Posteriormente, Oguri y cols. determinaron la expresión de MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 y MRP5, mediante RT-PCR, en células mononucleares de sangre periférica de 10 pacientes con CPCNP avanzado, antes y después de la administración de quimioterapia con Carboplatino. La serie constaba de 7 hombres y 3 mujeres. La media de edad era 67 años. 4 eran carcinomas epidermoides, 6 adenocarcinomas. El tratamiento consistía en la administración de Carboplatino AUC7. Se realizaba una determinación justo antes de la administración, otra a las 6 horas y la última a las 24 horas. Se observó que MRP3 aumentaba tras la administración de quimioterapia, no así MRP1, MRP2, MRP4 ni MRP5. Este estudio también tenía una parte de evaluación en tejido tumoral. Determinaron la expresión de estos genes en 80 muestras de tejido

pulmonar de 40 pacientes con cáncer de pulmón (11 con CPCP) tratados con platino, 40 muestras correspondían a tejido tumoral y 40 a tejido sano. Los resultados son que MRP3 y MRP5 aumentan tras exposición a platino, mientras MRP1, MRP2 y MRP4 no. No se estudió la relación de la expresión con variables como respuesta a la quimioterapia o supervivencia.

En nuestra serie se ha estudiado la expresión de *mdr1* antes y después de la administración de quimioterapia con Paclitaxel- Carboplatino.

Inicialmente se realizó microarrays en 2 pacientes. Los dos eran varones, fumadores, de 63 y 71 años, diagnosticados de CPCNP, uno epidermoide y el otro adenocarcinoma, estadio IIIA, cT3N2, que iban a recibir tratamiento de inducción con Paclitaxel- Carboplatino. Se realizaron 2 extracciones: antes del ciclo1 y a los 21 días, antes del ciclo2. Se encontró sobreexpresión de *mdr1* y LRP.

Ante estos resultados se decidió estudiar la expresión de *mdr1* en pacientes con CPCNP, antes y después del tratamiento.

Desde Marzo de 2004 hasta Abril de 2007, se han reclutado un total de 23 pacientes, incluidos los 2 pacientes de bioarrays. Los únicos criterios que tenían que cumplir era el haber sido diagnosticados en nuestro hospital de CPCNP y recibir como tratamiento quimioterápico el esquema Paclitaxel- Carboplatino en nuestra Unidad de Oncología.

Hemos estudiado la expresión de ARN *mdr1* en PMN de sangre periférica antes y después de recibir quimioterapia con Paclitaxel- Carboplatino.

Para ello usamos la RT-PCR, como en otras investigaciones publicadas, incluidos los trabajos de Oguri y cols. (1998, 2000,2001).

Nuestra población de estudio tiene características similares a la población estándar de pacientes con CPCNP: la mayoría de los pacientes son varones (19:4), fumadores en todos los casos, excepto una paciente. Si bien la edad media de  $55\pm 10$  año es inferior a la estándar, y todos los pacientes mostraban buen estado general con un ECOG 0-1. Se escogieron principalmente pacientes con estadio avanzado ya que en ellos el tratamiento quimioterápico juega un papel fundamental. De ahí que el 90% corresponda a estadios III-IV.

En nuestra población de estudio, el 70% de los pacientes mostraba carcinoma epidermoide.

La mayoría de los pacientes al presentar estadio IV o IIIB, son pacientes de muy mal pronóstico, como refleja la mediana de supervivencia de 9 meses.

Se consideró como objetivo principal establecer la relación entre expresión de *mdr1* y la respuesta a la quimioterapia. Otras variables interesantes con las que podría tener relación *mdr1*, serían los factores pronóstico del CP. Por este motivo se estudió la relación de *mdr1* con género, pérdida de peso en el momento del diagnóstico, estadio tumoral TNM y localizaciones metastásicas, como forma de medir la carga tumoral. También se estimó que podría influir en la expresión de *mdr1* la histología del tumor. Además se evaluó la relación de la expresión de *mdr1* con la supervivencia global del paciente desde el diagnóstico. No se consideró el relacionar la expresión de *mdr1* con la toxicidad al tratamiento quimioterápico al no registrarse prácticamente toxicidades grado 3-4, solo alopecia. Si bien hubo una muerte relacionada con el tratamiento (sepsis) y un episodio de neutropenia febril.

Se ha detectado sobreexpresión en 22 de los 23 pacientes. De forma aleatoria, puesto que no hay estudios previos, decidimos clasificar los niveles de expresión como nivel bajo 1-3, y nivel alto >4. Se encontró que 11 pacientes presentaron niveles bajos y 11 niveles altos. Sin embargo, ni la sobreexpresión ni los niveles de expresión, se han relacionado con la tasa de respuestas. De hecho de los 11 pacientes que progresaron al tratamiento 5 tenían niveles bajos y 6 niveles altos. De los que presentaron respuesta (respuesta parcial o estabilización) 6 tenían niveles bajos y 4 niveles altos. El paciente intervenido antes del tratamiento antitumoral, mantuvo la respuesta completa, pero presentaba niveles altos de expresión de *mdr1*. Por tanto no existe relación entre el nivel de expresión de *mdr1* y la respuesta a la quimioterapia por lo que concluimos que *mdr1* no es factor predictivo de respuesta al tratamiento.

Tampoco hubo relación con la supervivencia global, si bien en esta variable pueden influir otros factores como el hecho de que más del 60% de los pacientes recibieron posteriormente otro tipo de tratamiento oncológico activo (Radioterapia y quimioterapia concomitante, quimioterapia o erlotinib). No obstante concluimos que la expresión de *mdr1* no es factor pronóstico.

Asimismo tampoco se ha encontrado relación con sexo, hábito de fumar, o estadio tumoral. Al principio del estudio se consideró la hipótesis de que los pacientes con mayor carga tumoral presentarían mayores niveles de *mdr1*, que después no se ha confirmado.

En cuanto a la histología del tumor, el 80% de los casos de adenocarcinoma presentó niveles altos, frente al 46% de los casos de carcinoma epidermoide. Estos datos son contrarios a los encontrados en otros estudios que han encontrado mayor expresión de genes *mdr* en carcinoma epidermoide (Ota y cols., 1995; Nooter y cols., 1996; Harada y cols., 2003). Si bien, no hay una relación claramente establecida entre histología y expresión de proteínas *mdr*.

Podemos concluir, a raíz de nuestros resultados, que la expresión de *mdr1* en linfocitos de sangre periférica medida por RT-PCR no se relaciona con tasa de respuestas a la quimioterapia, ni con otras variables como supervivencia global, género, fumar, pérdida de peso, estadio tumoral e histología.

# Conclusions



We conclude that:

- 1.- Paclitaxel and carboplatin drugs, usually employed in LC patients, produced a dosage-time dependent proliferation inhibition of cultured tumour cells, although histologic type (LC derived- and non derived cells as) and specific features of each cell line (LC cells) modulate the response to these drugs.
- 2.- Treatment of primary LC cells (A549 and A427) with paclitaxel and carboplatin induced typical morphological changes similar to those observed in other tumours derived-cell lines (SEM, GAS, MCF7). These changes were not observed in metastasis-derived LC cell line (NODO).
- 3.- After 72 h of treatment with paclitaxel and carboplatin, we observed the presence of nuclei of cells, in the studied cell lines in LC and other tumours-derived cell lines (SEM, GAS, and MCF7), which were maintained and spread all through the time, despite the continuous presence of the drugs in the culture medium.
- 4.- Plasma concentrations of paclitaxel and carboplatin induced apoptosis in the studied cell lines. Apoptosis was higher in LC derived cells than in those derived from other tumours. Our results demonstrated that the association of both drugs increases apoptosis in tumour cells.
- 5.- Plasma concentrations of paclitaxel induced MDR1 expression but not MRP3 in LC and other tumours derived cell lines. However, carboplatin produced overexpression of MRP3 but not MDR1 in the same cell lines.
- 6.- The combination of both drugs at plasma concentrations was not able to activate a new resistance mechanism in the studied cell lines, but surprisingly it was able to improve the resistance mechanism induced by each one of the drugs individually. This fact resulted in an increase of MDR1 expression with paclitaxel and MRP3 expression with carboplatin.
- 7.- Preliminary studies on microarrays of peripheral blood of NSCLC patients before and after treatment with paclitaxel-carboplatin suggest a differential expression of the genes family that codify for transporting proteins implicated in drugs resistance, including MDR1 and LRP.

- 8.- The study of MDR1 with RT-PCR in peripheral blood of NSCLC patients demonstrated that the combined treatment with paclitaxel-carboplatin induces modulation of this gene expression (overexpression).
- 9.- Statistical study about the correlation between MDR1 expression as marker of peripheral blood of NSCLC patients treated with paclitaxel-carboplatin and the patients treatment response, determined that MDR1 values in PMN of these patients is not a predictive factor of treatment response nor a prognostic factor of the disease evolution.

# Bibliografía

- Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, y cols. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2004; 91(5):1043-1052.
- Albain KS, Scott CB, Rusch VR, y cols. Phase III study of concurrent chemotherapy and full course radiotherapy (CT/RT) versus CT/RT induction followed by surgical resection for stage IIIA(pN2) non small cell lung cancer: First outcome analysis of North American Intergroup trial 0139. *Lung Cancer* 2003; 41(suppl 2, abstr PL-4): S4.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21S-49S.
- Alberola, Juan. Cáncer de pulmón no microcítico. En Colomer,R. *Oncología Médica*. Madrid: Nova Sidonia Oncología; 1999.P 407-443.
- Alexiou C, Onyeaka CV, Beggs D, y cols. Do women live longer following lung resection for carcinoma? *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21:319-325.
- Allen JD, Schinkel AH. Multidrug Resistance and Pharmacological Protection Mediated by the Breast Cancer Resistance Protein. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1: 427-434.
- Arceci RJ. Clinical Significance of P-Glycoprotein in Multidrug Resistance Malignancies. *Blood* 1993; 81: 2215-2222.
- Ashton RW, NET JR. Sceening para cancer de pulmón no microcítico. *Semin Oncol* 2005; 32: 253-258.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, y cols. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9:3-28.
- Basche M, Kelly K. Treatment of non small cell lung cancer in older persons. *Oncology* 2003; 17:31-39.
- Beck WT,Grogan TM, William CL, y cols. Methods of detect P-Glicoprotein- associated multidrug resistance in patients tumors: consensus recomendations. *Cancer Res* 1996; 56: 3010-3020.
- Beck, Dalton. Mechanisms of drug resistance. En: De Vita, Hellman, Rosenberg, editores. *Cancer and practice of oncology*, 6ª ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 2001. P 498.

- Beer DG, Kardia SLR, Huang CC, y cols. Gene-expression profiles predict survival of patient with lung adenocarcinoma. *Nature Medicine* 2002; 8:816-824.
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, y cols. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/CMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1735-1741.
- Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, y cols. Meta and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogénesis* 2002; 23:1343-50.
- Bennett WP, Colby TV, Travis WD, y cols. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993; 53:4817-4822.
- Berger W, Setinek U, Hollaus P, y cols. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131:355-363.
- Blagosklonny MV. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. *Trends Mol Med.* 2003;9 (7):307-312.
- Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, y cols. EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40:2201-2216.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 537-592.
- Borst P, Evers R, Kool M, y cols. A family of drug transporters: the Multidrug Resistance Associated Protein. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1295-1302.
- Bradshaw D, Arceci J. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Onco*1998; 16: 3674-3690.
- Brambilla C, Fievet F, Jeanmart F, y cols. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J* 2003;21(Suppl 39):36-44.
- Brooks KR, To K, Joshi MB, y cols. Measurements of chemoresistance markers in patients with stage III non small cell lung cancer: a novel approach for patient selection. *Ann Thorac Surg* 2003;76: 187-193.

- Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037-1057.
- Buchler M, Konig J, Brom M, y cols. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271:15091-15098.
- Bunn PA. Early detection of lung cancer using serum RNA or DNA markers: ready for "prime time" or for validation? *J Clin Oncol* 2003; 21:3891-3893.
- Burger H, Foekens JA, Look MP, y cols. RNA expression of BCRP, LRP, MRP1-2, and MDR1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 827-836.
- Burns DM .Cigarette smoking. En Aisner j, editors. *Comprehensive textbook of thoracic oncology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p 51.
- Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, y cols. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 1992; 79: 473-476.
- Candeil L, Gourdier I, Peyron D, y cols. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer*. 2004; 109:848-854.
- Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, y cols. Immunohistochemical detection of P-Glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990; 8:689-704.
- Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66:85-94.
- Chen JC, Chen YC, Chen CY, y cols. Loss of p16 and/or pRb protein expression in NSCLC. An immunohistochemical and prognostic study. *Lung cancer* 2001; 31:163-170.
- Christensen PM, Gotzsche PC, Brosen K. The sparteine/debrisoquine (CYP2D6) oxidation polymorphism and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 51:389-393.

- Coggon D, Harris EC, Poole J, y cols. Extended follow up of a cohort of british chemical workers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1608-1615.
- Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH,y cols. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258:1650-1654.
- Cole SPC, Sparks KE, Fraser K, y cols. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5902-5910.
- Coley HM, Workman P, Twentyman PR. Retention of activity by selected anthracyclines in a multidrug resistant human large cell lung carcinoma line without PgP hyperexpression. *Br J Cancer* 1999; 63: 351-357.
- Curran, Scout, Langer, y cols. Long term benefit is observed in a phase III comparison of sequential vs concurrent chemo-radiation for patients with unresected stage III non small cell lung cancer: RTOG 9410. *J Clin Oncol* (in press).
- Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, y cols. Drugs resistance in multiple myeloma and non Hodgkin´s lymphoma. *J Clin Oncol* 1989a; 7: 415-424.
- Dalton WS, Grogan TM, Rybski JA, y cols. Inmunohistochemical detection and quantitation of P-glycoprotein in multiple drugs resistant human myeloma cells. *Blood* 1989b; 73: 747-752.
- Dalton WS, Scheper RJ. Lung Resistance Related Protein: determining its role in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1604-1605.
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys acta* 1973; 323:466-483.
- Darby SC, Hill D, Auvinen A, y cols. Radon in homes risk of lung cáncer: collaborative analysis of individual data from 13 european case-control studies. *BMJ* 2005; 330:223-226.
- Das GC, Holiday D, Gallardo R,y cols. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett.* 2001;165 (2):147-153.

- Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, y cols. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* 2003; 163: 1567-1577.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11: 1156-1166.
- Dean M. The human ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily. NCBI 2002.
- Delmotte P, Martin B, Paesmans M, y cols. VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Rev Mal Respir* 2002; 19 577-584.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, y cols. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* 1996; 274:430-432.
- Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, y cols. Preoperative chemotherapy followed by surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIA non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:247-253.
- Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, y cols. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol.* 2002; 198:213-219.
- Dillman RO, Herndon J, Seagren SL, y cols. Improved survival in stage III non small cell lung cancer: Seven year follow up of Cancer and Leukemia Group B (CALG-B) 8433 trial. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1210-1215.
- Ding S, Chamberlain M, McLaren A, y cols. Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1. *Br J Cancer* 2001; 85: 1175–1184.
- Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S, y cols. Topoisomerase II $\alpha$  and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32:117- 128.



- Dingemans AC, van Ark-Otte J, van der Valk P, y cols. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncol* 1996; 7: 625-630.
- Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J* 1950; 2: 739-748.
- Dómine, León, Lobo. Aspectos clínicos del Cáncer de pulmón. En González Barón M, Castro J, editores. *Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI*. Madrid: Ars Médica, 2006.P57-86.
- Dômont J, Soria JC, Le Chevalier T. Adjuvant Chemotherapy in Early Stage non Small Cell Lung Cancer. *Semin Oncol* 2005; 32:279-283.
- Douillard JY, Rosell R, De Lena M, y cols. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non small cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA): a randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 719-727.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22:7340-7358.
- Earle CC, Tsai JS, Gelber RD, y cols. Effectiveness of chemotherapy for advanced lung cancer in the elderly: instrumental variable and propensity analysis. *J Clin Oncol* 2001; 19:1064-1070.
- Endoh H, Tomida S, Yatabe Y y cols. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004; 22:811-819.
- Engblom P, Rantanen V, Kulmala J, y cols. Carboplatin-paclitaxel- and carboplatin-docetaxel-induced cytotoxic effect in epithelial ovarian carcinoma in vitro. *Cancer* 1999; 86:2066 –2073.
- Epstein J, Xiao H, Koba B. P-glycoprotein expression in plasma cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood* 1989; 74:913-917.
- Feld R, Abratt R, Graziano S, y cols. Pretreatment minimal staging and prognostic factors for non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 17:S3-S10.

- Felip E. Manual Práctico del Cáncer de Pulmón no Microcítico. Madrid: Arán; 2007.
- Feliú J, Casado E, Belda C, y cols. Tratamiento médico del cáncer de pulmón. En González Barón M, Castro J, editores. Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI. Madrid: Ars Médica, 2006.p169-196.
- Fernández JE, Prados J, Melquizo C, y cols. Characterization of a new human embryonal rhabdomyosarcoma cell line, RMS-GR. Jpn J Cancer Res. 1998 May; 89(5):525-532.
- Fernández Navarro, Álvarez-Sala, Alcolea, y cols. Estudio diagnóstico y de extensión del CP. En González Barón M, Castro J, editores. Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI. Madrid: Ars Médica, 2006.p87-100.
- Filipits M, Haddad V, Schmid K, y cols. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. Clin Cancer Res 2007; 13:3892-3898.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, y cols. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 1996; 148: 1237-1247.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, y cols. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 265-269.
- Fosella F, DeVore R, Kerr R, y cols. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non small cell lung cancer previously treated with platinum containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non Small Cell Lung Cancer Study Group. J Clin Oncol 2000; 18:2354-2362.
- Fosella F, Pereira JR, von Pawell J, y cols. Randomized multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non small cell lung cancer: The TAX326 Study Group. J Clin Oncol 2003; 21:3016-3024.
- Fournel P, Robinet G, Thomas P, y cols. Randomized phase III trial of sequential chemoradiotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy in locally advanced non small cell lung cancer:

Groupe Lyon- Saint- Etienne d'Oncologie Thoracique Groupe Français de Pneumo- Cancerologie NPC 95-01 study. *J Clin Oncol* 2005; 23:5859-5861.

- Frei E. Patobiología del cáncer. En: Rubenstein E, Federman DD, editores. *Oncología*. Madrid: Editora Científica Médico Latinoamericana, 1987; p. 29-51.
- Fukuda M, Oka M, Soda H, y cols. Phase I Study of Irinotecan Combined with Carboplatin in Previously Untreated Solid Cancers. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3963-3969.
- Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, y cols. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:2692-2699.
- Garrido, López García, Ugidos de la Varga, y cols. Factores pronóstico del cáncer de pulmón. En González Barón M, Castro J, editores. *Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI*. Madrid: Ars Médica, 2006.p109-128.
- Gatzemeier U, Groth G, Butts C, y cols. Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER-2 positive non small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15:19-27.
- Georgiadis MS, Schuler BS, Brown JE, y cols. Paclitaxel by 96-hour continuous infusion in combination with cisplatin: a phase I trial in patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol*. 1997 Feb; 15(2):735-743.
- Geromin A, Michieli M, Damiani D, y cols. Cancer chemotherapy does not enhance MDR-associated 170 kd glycoprotein expression in normal blood mononuclear cells. *Haematologica* 1992: 470-472.
- Giaccone G, Gazdar AF, Beck H, y cols. Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cells associated with topoisomerase II expression. *Cancer Res* 1992; 52: 1666-1674.
- Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, y cols. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial INTACT-1. *J Clin Oncol* 2004; 22:778-785.

- Giovannetti E, Mey V, Danesi R, y cols. Interaction between gemcitabine and topotecan in human non-small-cell lung cancer cells: effects on cell survival, cell cycle and pharmacogenetic profile. *Br J Cancer*. 2005; 92(4):681-689.
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, y cols. Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 81:116-124.
- Gómez Román JJ, Cifrián Martínez J, Fernández Rozas S, y cols. Ausencia de mutaciones del gen de la beta tubulina en carcinomas pulmonares no microcíticos. *Arch Bronconeumol* 2003; 39(Supl 2):1-160.
- González Barón M. Prefacio. En González Barón M, Castro J, editores. *Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI*. Madrid: Ars Médica, 2006.p 9-11.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:385-427.
- Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, y cols. Overexpression of Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) Increases Resistance to Natural Product Drugs. *Cancer Res* 1994; 54: 357-361.
- Gregorc V, Ludovini V, Pistola L, y cols. Relevance of p-53, bcl-2 and Rb expression on resistance to cisplatin-based chemotherapy in advanced non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 39:41-48.
- Gridelli C, Aapro M, Ardizzoni A, y cols. Treatment of advanced non small cell lung cancer in the elderly. Results of an international expert panel. *J Clin Oncol* 2005; 23:3125-3137.
- Gros P, Ben Neriah JM, Croop JM, y cols. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323: 728-731.
- Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, y cols. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non small cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1589-1597.
- Harada T, Ogura S, Yamazaki K, y cols. Predictive value of expression of p53, bcl-2 and lung resistance protein for response to chemotherapy in non small cell lung cancers. *Cancer Science* 2003; 94:394-399.

- Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, y cols. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004; 22: 785-794.
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, y cols. Membrane topology of the multidrugresistance protein (MRP). A study of glycosylation- site mutants reveals an extracytosolic NH2 terminus. *J Biol Chem* 1997; 272: 23623-23630.
- Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999; 274:15181-15185.
- Hirsch FR, Bunn PA, Dimitrovsky E, y cols. IV international conference on prevention and early detection of lung cancer, Reykjavik, Iceland, august 9-12, 2001. *Lung Cancer* 2002; 37:325-344.
- Hoffmann D, Hoffmann I, Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. *Chem Res Toxicol* 2001; 14 (7): 767-790.
- Holmes J, Jacobs A, Carter G, y cols. Multidrug resistance in haemopoietic cell lines myelodysplastic syndromes and acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1989; 72: 40-44.
- Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, y cols. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1458-1460.
- Houlston RS. CYP1A1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 2000; 10:105-14.
- Houlston RS. Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 675-682.
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, y cols. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 342-347.
- Huizing MT, Keung AC, Rosing H, y cols. Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum pretreated ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 1993; 11 :2127 –2135.

- Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999; 20:1507-1510.
- Izquierdo MA, Neefjes JJ, Mathari AE, y cols. Overexpression of de ABC transporter TAP in multidrug-resistant human cancer cell lines. *Br J Cancer* 1996; 74: 1961-1967.
  - Janerich DT, Thompson D, Varela LR, y cols. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the house hold. *N Engl J Med* 1990; 323:632-636.
  - Jiroutek M, Johson D, Blum R, y cols. Prognostic factors in advanced non small cell lung cancer: analysis of ECOG trials from 1981-1992. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 1998; 17:461 (abstr 1774).
  - Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976 455:152-162.
  - Jung M, Grunberg S, Timblin C, y cols. Paclitaxel and vinorelbine cause synergistic increases in apoptosis but not in microtubular disruption in human lung adenocarcinoma cells (A-549). *Histochem Cell Biol* 2004; 121(2):115-121.
  - Jung R, Soondrum K, Kruger W, y cols. Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. *Recent Results Cancer Res* 2001; 158: 32-39.
  - Kaminsky N, Krupsky M. Gene expression patterns, prognostic an diagnostic markers and lung cancer biology. *Chest* 2004; 125(Suppl):111-115.
  - Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, y cols. Expression of Multidrug Resistance-related Transporters in Human Breast Carcinoma. *Jpn. J Cancer Res* 2001; 92:452–458.
  - Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, y cols. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin–Johnson syndrome. *Hepatology* 1996; 23:1061-1066.

- Kasahara K, Fujiwara Y, Sugimoto Y, y cols. Determinants of response to the DNA topoisomerases II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 113-118.
- Kato H, Ichinose Y, Ohta M, y cols. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 2004; 350: 1713-1721.
- Kavallaris M. The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anticancer Drugs*. 1997;8 (1):17-25.
- Kawabata S, Oka M, Soda H, y cols. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3052-3057.
- Kedersha NL, Miquel MC, Bittner D, y cols. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J Cell Biol* 1990; 110: 895–901. |
- Kedersha NL, Rome LH .Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* 1986; 103 (3): 699-709.
- Keller SM, Adak S, Wagner H, y cols. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2000; 343: 1217-1222.
- Kelly K, Crowley J, Bunn PA, y cols. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non small cell lung cancer: a southwest oncology group trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3210-3218.
- Keppler D, Kartenbeck J. The canalicular conjugate export pump encoded by the cMRP/cMOAT gene. *Prog Liver Dis* 1996; 14: 55-67.
- Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, y cols. Multidrug Resistance and the lung resistance related protein in human colon carcinoma SW620 cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1647-1653.
- Komdeur R, Plaat BE, van der Graaf WT, y cols. Expression of multidrug resistance proteins, PgP, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *Eur J Cancer* 2003; 39: 909-916.

- König J, Rost D, Cui Y, y cols. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999; 29:1156-1163.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, y cols. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 3537-3547.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, y cols. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59:175-182.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, y cols. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6914-6919.
- Langer CJ, Manola J, Bernardo P, y cols. Cisplatin based therapy for elderly patients with advanced non small cell lung cancer: implications of Eastern Cooperative Oncology Group 5592, a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:173-181.
- Langer CJ, Stephenson P, Thor A, y cols. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern cooperative oncology group study 2598. *J Clin Oncol* 2004; 22:1180-1187.
- Langmann T, Mauerer R, Zahn A, y cols. Real Time Reverse Transcription PCR Expression Profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; 49: 230-238.
- Le Chevalier T, Arriagada R, Quoix E, y cols. Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in unresectable non small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 1994; 10 (suppl. 1): S239-S244.
- Lee K, Belinsky MG, Bell DW, y cols. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res* 1998; 58: 2741-2747.



- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, y cols. Characterization of the ATP-dependent leukotriene C<sub>4</sub> export carrier in mastocytoma cells. *Eur J Biochem* 1994; 220: 599-606.
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist* 2003; 8:411-424.
- López Vivanco G. Tumores torácicos. *Rev Cancer* 2005; 19:73-75.
- Lord R, Brabender J, Gandara D, y cols. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Can Res* 2002;8: 2286-2291.
- Lu M, Wang J, Yi X, y cols. Clinical significance of the expression of lung resistance protein in non small cell lung. *Zhong-hua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24: 458-460.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, y cols. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to Gefitinib. *N Eng J Med* 2004;3 50:2129-2139.
- Maliepaard M, Scheffler GL, Faneyte IF, y cols. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 3458-3464.
- Manegold C, von Pawel J, Zatloukal P, y cols. BO17704 (AVAIL): A phase III randomised study of first-line bevacizumab combined with cisplatin/gemcitabine in patients with advanced or recurrent non-squamous, non-small cell lung cancer (NSCLC). *ESMO* 2008.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal* 2005; 7: 118-133.
- Marie JP, Zittoun R, Sikic BL. MDR1 gene expression in adult acute leukemias. *Blood* 1991; 78: 586-592.
- Mariño, García, Nistal. Patología del cáncer no microcítico de pulmón. En González Barón M, Castro J, editores. *Cáncer No Microcítico de Pulmón. Un reto en el siglo XXI*. Madrid: Ars Médica, 2006.p29-56.
- Marsh RE, Tuszyński JA, Sawyer MB, y cols. Emergence of power laws in the pharmacokinetics of paclitaxel due to competing saturable processes. *J Pharm Pharm Sci*. 2008; 11(3):77-96.

- McAleer MA, Breen MA, White N, y cols. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1999; 274:23541-23548.
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, y cols. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 1998; 4:389-398.
- Meert AP, Martin B, Paesmans M, y cols. The role of HER-2/*neu* expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959-965.
- Meert AP, Paesmans M, Martin B, y cols. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002; 87:694-701.
- Melguizo C, Prados J, Aneiros J, y cols. Differentiation of a human rhabdomyosarcoma cell line after antineoplastic drug treatment. *J Pathol.* 1995 Jan; 175(1):23-29.
- Meyerson M, Franklin WA, Kelley MJ. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Semin Oncol* 2004; 31 (Suppl 1):4-19.
- Microarrays. Disponible en: <http://www.appliedmicroarrays.com>.
- Miller VA, Kris MG, Shah N, y cols. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:1103-1109.
- Monzó M, Rossell R, Sánchez JJ, y cols. Paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol* 1999;17:1786-1793.
- Nagai K, Tsuchiya R, Mori T, y cols. A randomized trial comparing induction chemotherapy followed by surgery alone for patients with stage IIIA N2 non small cell lung cancer (JCOG 9209). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125:254-260.
- National Cancer Institute. Guidelines 2008.

- Newcomb PA, Carbone PP. The health consequences of smoking: cáncer. *Med Clin North Am* 1992; 76: 305-331.
- Niehans GA, Jaszcz W, Brunetto V, y cols. Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphoma. *Cancer Res* 1992; 52: 3768-3775.
- Non Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non small cell lung cancer: a metaanalysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Br Med J* 1995; 311:899-909.
- Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, y cols.: Quantitative analysis of MDR1 gene in human tumors by PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7160-7164.
- Nooter K, Bosman FT, Burger H, y cols. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 1996; 7:75-81.
- O'Brian CA, Ward NE, Gravitt KR, y cols. The role of protein kinase C in multidrug resistance. *Cancer Treat Res* 1994; 73:41-55.
- Ofir R, Seidman R, Rabinski T, y cols. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* 2002;9(6):636-642.
- Oguri T, Fujiwara Y, Ochiai M, y cols.: Expression of LRP gene is not associated with platinum drug exposure in lung cancer. *Anticancer Res* 1998; 18: 4159-4162.
- Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, y cols. Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer.* 2001;93 (4):584-589.
- Oguri T, Isobe T, Suzuki T, y cols. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer.* 2000; 86(1):95-100.
- Oka M, Fukuda M, Sakamoto A, y cols. The clinical role of MDR1 gene expression in human lung cancer. *Anticancer Res* 1997; 17 (1B): 721-724.

- Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, y cols. Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 1998; 11:1059-1063.
- Ota E, Abe Y, Oshika Y, y cols.: Expression of the multidrug resistance associated protein gene in non small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 550-554.
- Páez JG, Jänne PA, Lee JC, y cols. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response in gefitinib therapy. Disponible en: <http://www.sciencexpress.org/> 29april2004
- Paredes A, Blanco C, Echenique- Elizondo M, y cols. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos y resistencia a la quimioterapia en el cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol* 2007; 43:479-484.
- Paredes A, Blanco JL, Echenique-Elizondo M. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cir Esp* 2006; 79(4):202-214.
- Pass HI, Pogrebniak HW, Steinberg SM, y cols. Randomized trial of neoadjuvant therapy for lung cáncer: Interim Analysis. *Ann Thorac Surg* 1992; 53: 992-1008.
- Pastan I, Gottesman MM. Multidrug resistance. *Ann Rev Med* 1991;42: 277-286.
- Pathak AK, Singh N, Khanna N, y cols. Potentiation of the Effect of Paclitaxel and Carboplatin by Antioxidant Mixture on Human Lung Cancer H520 Cells. *Journal of the American College of Nutrition* 2002; 21: 416-421.
- Perri T, Fogel M, Mor S, y cols. Effect of P-glycoprotein expression on outcome in the Ewing family of tumors. *Pediatric hematology and oncology* 2001, 18:325-334.
- Peto R, Lopez A, Boreham J, y cols. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992; 339:1268-1278.

- Pfister D, Johnson D, Azzoli C, y cols. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non small cell lung cancer guidelines. *J Clin Oncol* 2004; 22:330-353.
- Pirker R, Wallner J, Geissler K, y cols.: MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 708-712.
- Pisters KM, Ginsberg RJ, Giroux DJ y cols. Induction chemotherapy before surgery for early stage lung cancer. A novel approach. Bimodality Lung Oncology Team. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:429-439.
- Pisters KM, Vallieres E, Bunn PA, y cols. S9900: a phase III trial of surgery alone or surgery plus preoperative paclitaxel/carboplatin chemotherapy in early stage non small cell lung cancer: preliminary results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 24 (Abstract 7012): 624.
- PORT Metaanalysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in non small cell lung cancer: Systematic review and metaanalysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257-263.
- Prados J, Melguizo C, Fernández JE, y cols. Induction of drug resistance in embryonal rhabdomyosarcoma treated with conventional chemotherapy is associated with HLA class I increase. *Neoplasma*. 2006;53 (3):226-231.
- Prados JC, Melguizo C, Marchal JA, y cols.: Multidrug Resistance Phenotype in the RMS-GR human rhabdomyosarcoma cell line obtained after polychemotherapy. *Jpn. J. Cancer Res* 1999; 90: 788-793.
- Pujol JL, Molinier O, Ebert W, y cols. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer* 2004;90:2097-2105.
- Rajagopal A, Simon SM. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3389-3399.
- Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, y cols. An assessment of Motorota Codelink™ microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Research* 2002, 30: 2-12.

- Rivera P, Detterbeck F, Mehta AC. Diagnosis of lung cancer. The guidelines. *Chest* 2003; 123:129S-136S.
- Rome L, Kedersha N, Chugani D. Unlocking vaults: organelles in search of function. *Trends Cell Biol* 1991: 47-50.
- Roninson IB. The role of the MDR1 gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 95-102.
- Rosell R, Gómez Codina J, Camps C, y cols. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 153-158.
- Rosell R. Toward customized trastuzumab in HER-2/*neu*-overexpressing non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:1171-1173.
- Ross JA, Rosen GD. The molecular biology of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:265-269.
- Rossell R, Taron M, Ariza A, y cols. Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer. *Semin Oncol* 2004;31(Suppl 1):20-27.
- Rostami-Hodjegan A, Lennard MS, Woods HF, y cols. Metaanalysis of studies of the CYP2D6 polymorphism in relation to lung cancer and Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 1998; 8:227-238.
- Roth J, Fosella F, Komaki R, y cols. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 673-680.
- Ruebe C, Riesenbeck D, Semik M, y cols. Neoadjuvant chemotherapy followed by preoperative radiochemotherapy plus surgery or surgery plus postoperative radiotherapy in stage III non small cell lung cancer: results of a randomized phase III trial of the German Lung Cancer Cooperative Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60:S130.
- Ruiz Gómez MJ, Souviron A, Martínez Morillo M. La glicoproteína P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *An Med Interna* 2002; 19:477-485.

- Salmon SE, Grogan TM, Miller T y cols.: Predictions of doxorubicin resistance in vitro in myeloma lymphoma, and breast cancer by P-glycoprotein staining. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 696-703.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, y cols. Paclitaxel – carboplatin alone or with bevacizumab for non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2542-2550.
- Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, y cols. ABCG2 a transporter for all reasons. *FEBS Lett* 2004;567:116-120.
- Sato H, Gottesman MM, Goldstein LJ, y cols. Expression of the multidrug resistance gene in myeloid leukemias. *Leuk Res* 1990; 14: 11-21.
- Sauna ZE, Smith MM, Muller M, y cols. The mechanism of action of multidrug resistance linked P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr* 2001; 33: 481-491.
- Sause W, Kolesar P, Taylor SI, y cols. Final results of phase III trial in regionally advanced unresectable non small cell lung cancer: Radiation Therapy Oncology Group, Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group. *Chest* 2000; 117:358-364.
- Savaraj N, Wu C, Wangpaichitr M, y cols. Overexpression of mutated MRP4 in cisplatin resistant small cell lung cancer cell line: collateral sensitivity to azidothymidine. *Int J Oncol*. 2003; 23(1):173-179.
- Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, y cols. Phase III randomized trial comparing three platinum based doublets in advanced non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:4285-4291.
- Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, y cols. Randomized study of adjuvant chemotherapy for completely resected stage I, II or IIIA non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1453-1461.
- Scagliotti GV, Novello S, Selvaggi G. Multidrug Resistance in non-small-cells lung cancer. *Ann Oncol* 1999; 10: 83-86.
- Scagliotti GV. Preliminary results of Ch. E.S.T.: a phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative gemcitabine-cisplatin in early stages non small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 24: (abstract 7023) 552.

- Scheffer GL, Maliepaard M, Pijnenborg AC, y cols. Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res* 2000; 60:2589-2593.
- Schiller JH, Harrington D, Belani CP, y cols. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92-98.
- Schrump D, Altorki N, Henschke C, y cols. Non small cell lung cancer. *Principles and Practice of Oncology*, 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 2005. p 753-809.
- Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, y cols. MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 1999; 5:1048-1051.
- Schwartz AG. Genetic predisposition to lung cancer. *Chest* 2004; 125 (Suppl):86-9.
- Sekido Y, Fong K, Mina J. Molecular biology of lung cancer. En De Vita V, Hellman S, Rosenberg S, editores. *Principles and Practice of Oncology*, 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 2005. p 745-752.
- Selvagi G, Scagliotti GV, Torri V, y cols. HER-2/*neu* overexpression in patients with radically resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2002; 94:2669-7264.
- Sheper RJ, Broxterman HJ, Sheffer GL, y cols.: Overexpression of a M(r)110,000 vesicular protein in non P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 1993; 53: 1475-1479.
- Shepherd F, Dancey J, Ramlau R, y cols. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non small cell lung cancer previously treated with platinum based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18:2095-2103.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira JR, Ciuleanu T, y cols. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials group. Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-132.
- Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, y cols. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:803-811.



- Sorensen M, Autrup H, Tjonneland A, y cols. Glutathione s-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int J Cancer* 2004; 110; 219-224.
- Sörenson S, Glimelius B, Nygren P. A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. *Acta Oncol* 2001; 40(2-3):327-339.
- Sozzi G, Conte D, Leon ME, y cols. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer *J Clin Oncol* 2003;21:3902-3908.
- Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000; 65: 95-106.
- Steels E, Paesmans M, Berghmans T, y cols. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Eur Respir J* 2001;18:705-719.
- Stephen AG, Raval-Fernández S, Huynh T, y cols. Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the Major Vault Protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 23217-23220.
- Strauss GM, Herndon J, Maddaus MA, y cols. Randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and carboplatin following resection in stage IB non small cell lung cancer: Report of cancer and Leukemia Group B (CALGB) Protocol 9633. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 22(abstr 7019): 1128.
- Su GM, Davey MW, Davey RA. Induction of broad drug resistance in small cell lung cancer cells and its reversal by paclitaxel. *Int J Cancer* 1998 ; 76(5):702-708.
- Sugawara I, Yamada H, Nakamura H, y cols. Preferential expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. *Int J Cancer* 1995; 64:322-325.
- Sukhai M, Piquette-Miller M. Regulation of the Multidrug Resistance Genes by Stress Signals. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2000; 3(2): 268-280. *Surg Oncol* 2004; 5: 10-22.

- Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, y cols. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms an survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:527-533.
- Tada Y, Walda M, Kuroiwa K, y cols. MD1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter regien in blodder cancer during chemotherapeutic tratment. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4618-4627.
- Taneja TK, Sharma S. Markers of small cell lung cancer. *World J Surg Oncol* 2004; 5: 10-22.
- Taron M, Rosell R, Felip E, y cols. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Human Molecular Genetics*, 2004; 13:2443-2449.
- The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin- based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 351-360.
- Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.* 1998; 58(16):3620-3626.
- Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, y cols. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press, 2004.
- Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of mdr1/gp170 expression and its posible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 917-931.
- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman M, y cols. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3004-3008.
- van der Zee AG, Hollema H, Suurmeijer AJ, y cols. Value of P-glycoprotein, glutathione S-transferase pi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas. *J Clin Oncol* 1995; 13:70-78.
- van Meebeek JP, Kramer G, van Schil PE, y cols. A randomized trial of radical surgery versus thoracic radiotherapy in patients with stage IIIA-N2 non small-cell lung cancer after response to induction chemotherapy (EORTC 08941). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005; 23:LBA7015.

- van Zon A, Mossink MH, Schoester M, y cols. Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 37715 -37721.
- Vineis P, Veglia F, Benhamou S, y cols. CYP1A1 T3801 C polymorphisms and lung cancer a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *Int J Cancer* 2003; 104:650-657.
- Volm M, Mattern J, Koomagi R. Expression of lung resistance-related protein (LRP) in non-small-cell lung carcinomas of smokers and its predictive value for doxorubicin resistance. *Anticancer Drugs* 1997; 8: 931-936.
- Wardwell NR, Massion PP. Estrategias nuevas para la detección precoz y prevención del cáncer de pulmón. *Semin Oncol* 2005; 32:259-268.
- Weigel TL, Lotze MT, Kim PK, y cols. Paclitaxel-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines is associated with increased caspase-3 activity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 795-803.
- Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, y cols. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 1091-1094.
- Westfall SD, Skinner MK. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(11):1764-1771.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, y cols. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:7476-7481.
- Wingo PA, Cardínez CJ, Landis SH, y cols. Long terms trends in cancer mortality in the Unites States. *Cancer* 2003; 97:3133-3275.
- Winton TL, Livingston R, Johnson D, y cols. Vinorelbine plus Cisplatin vs observation in resected non small cell lung cancer. *N Engl J M* 2005; 352: 2589-2597.
- Wright S , Boag A, Valdimarsson G, y cols. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2279-2289.

- Yanase K, Tsukahara S, Asada S, y cols. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2004; 3 (9):1119-1125.
- Yangliang L, Marie-Jeanne M, Andrew R, y cols. A common polymorphism in XRCC1 as a biomarker of susceptibility for chemically induced genetic damage. *Biomarkers* 2003; 8:408-415.
- Yangliang L, Marie-Jeanne M, Andrew R, y cols. A common polymorphism in XRCC1 as a biomarker of susceptibility for chemically induced genetic damage. *Biomarkers* 2003; 8:408-415.
- Yeung TK, Germond C, Chen X, y cols. The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 263(2):398-404.
- Yoh K, Ishii G, Yokose T, y cols. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1691-1697.
- Yoshida M, Suzuki T, Komiya T, y cols. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int J Cancer.* 2001;94 (3):432-437.
- Young LC, Campling BG, Cole SP, y cols.: Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1 and MRP2 in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1798-1804.
- Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, y cols. Expression of Multidrug Resistance Protein-related Genes in Lung Cancer :correlation with Drug Response. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 673-680.
- Zhang P, Gao WY, Turner S. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Mol Cancer.* 2003 ; 3;2:1.
- Zhao J, Kim JE, Reed E, y cols. Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer. *Int J Oncol* 2005; 27(1):247-256.

