



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGIA MEDICA**

**IDENTIFICACION DE PERFILES GENETICOS  
PREDICTORES DE RESPUESTA A  
QUIMIOTERAPIA BASADA EN PLATINO EN  
PACIENTES CON CANCER DE PULMON DE  
CÉLULAS NO PEQUEÑAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGIA MEDICA**

**PRESENTA: DR MARCO ANTONIO GARCIA HERNANDEZ**

**DR OSCAR G ARRIETA RODRIGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**



**AGOSTO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AUTORIZACIÓN DE TESIS**

---

**Dra. Silvia Verónica Villavicencio Valencia**

**Titular de la Unidad de Enseñanza**

**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**Dr. Fernando U. Lara Medina**

**Profesor Titular del Curso Universitario de Oncología Médica**

**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**M. en C. Dr. Oscar G. Arrieta Rodríguez**

**Asesor de Tesis**

## **INVESTIGADORES ASOCIADOS**

- **Dr. Omar Macedo Pérez**
  - **Adscrito al servicio de la Clínica de Tórax en el INCan**
- **D. en C. Allete Ortega Gómez**
  - **Adscrita al servicio de Medicina Traslacional INCan**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Arrieta por su ejemplo y generosidad con los jóvenes oncólogos.

Al Dr. Lara por su lucidez en la docencia y entrega a sus alumnos.

A mis investigadores asociados Dr. Macedo, Dra. Allete por su amistad y sobre todo por su derroche científico y docente.

A mi esposa Jennifer que sin condición me acompaño por este largo camino.

A mis padres y hermanos por su paciencia y apoyo.

A Emiliano mi gran tesoro.

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>MARCO TEORICO .....</b>	<b>8</b>
EPIDEMIOLOGÍA .....	8
FACTORES DE RIESGO.....	8
FISIOPATOGENIA Y ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER DE PULMÓN. ....	9
ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER DE PULMÓN .....	10
FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS .....	12
PERFILES GENÉTICOS Y TÉCNICA DE MICROARREGLOS .....	13
GENERALIDADES DE TRATAMIENTO .....	15
NUEVAS OPCIONES DE TRATAMIENTO BASADOS EN ALTERACIONES GENÉTICAS.....	16
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
OBJETIVO PRINCIPAL.....	18
OTROS OBJETIVOS.....	18
<b>HIPOTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS. ....</b>	<b>19</b>
TIPO DE ESTUDIO Y LUGAR DE ELABORACIÓN .....	19
POBLACIÓN A ESTUDIAR .....	19
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	19
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	19
TAMAÑO DE LA MUESTRA ESTIMADA .....	20
VARIABLES A ESTUDIAR .....	20
DEFINICIONES: .....	21
OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE BIOPSIAS .....	21
EXTRACCIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA .....	21
MICROARREGLOS DE EXPRESION GENOMICA.....	22
EXPRESION GENOMICA: ANALISIS COMPUTACIONAL .....	22
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MOLECULARES TABLA .....	23
MUESTRAS ANALIZADAS .....	24
VALORES DE INTEGRIDAD DEL RNA. ....	25
CONTROL DE CALIDAD (CORRECCIÓN DE FONDO Y NORMALIZACIÓN DE DATOS) .....	25
CLASIFICACIÓN DE ESTADÍSTICOS .....	25
<b>DISCUSION .....</b>	<b>26</b>

# **Identificación de perfiles genéticos predictores de respuesta a quimioterapia basada en platino en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas**

## **RESUMEN**

El cáncer de pulmón de células no pequeñas es una de las neoplasias malignas más frecuentes, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Aproximadamente el 90% de los pacientes tiene enfermedad avanzada al momento del diagnóstico. El mejor tratamiento disponible actualmente ofrece una supervivencia global pobre, con una mediana de tan solo 8-12 meses.

Por décadas la base del tratamiento ha sido la quimioterapia citotóxica basada en un agente platinado (cisplatino ó carboplatino) en combinación con un agente de tercera generación (vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina ó pemetrexed). Lamentablemente este tratamiento solo ha modificado la tasa de respuesta entre un 13-16%. Sin embargo en los últimos años, la investigación en oncología se ha enfocado en el desarrollo de terapias dirigidas que actúen sobre el crecimiento celular al inhibir las vías de señalización necesarias para la proliferación celular maligna. Para cáncer de pulmón se han diseñado anticuerpos monoclonales como Bevacizumab y Cetuximab, inhibidores de los receptores de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) respectivamente con escaso beneficio. Los inhibidores tirosin-cinasa (ITK's) como Erlotinib, Gefitinib o Afatinib en pacientes con adenocarcinoma y mutaciones en el gen que codifica a EGFR ha demostrado aumentado en la supervivencia libre de progresión y tasas de respuesta, sin poder obtener una mejoría significativa en la supervivencia global.

El acceso a estos medicamentos en nuestro medio es difícil por el alto costo. Por tanto el uso de los agentes platinados es aun extenso. De particular interés es el conocer si existe algún biomarcador que sea un predictor de respuesta a platino lo que nos permitiría una medicina más individualizada. Un método innovador para

este fin es el estudio de los perfiles de expresión génica mediante microarreglos. Identificar algún gen que pudiera comprometer el adecuado funcionamiento celular alterando las vías de señalización cascada abajo podría relacionarse con la respuesta o nula respuesta a platinos. Lo que podría abrirnos las puertas a nuevos biomarcadores o vías de carcinogénesis.

## **MARCO TEORICO**

### **Epidemiología**

El cáncer de pulmón es el tumor maligno más frecuente en hombres en el mundo. En mujeres, ocupa el cuarto lugar en incidencia. El cáncer de pulmón es también el cáncer más mortal, independientemente del género. La incidencia anual es mayor de 1, 600,000 casos. Más de 1, 370,000 personas mueren anualmente por esta enfermedad. (1) El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), representa el 80- 85% de todos los pacientes con cáncer de pulmón, el resto es clasificado como cáncer de pulmón de células pequeñas con diferente comportamiento biológico y clínico. De los CPCNP, el 90-95% de los pacientes tiene enfermedad metastásica al momento del diagnóstico. La supervivencia mediana de estos pacientes, con tratamiento de soporte es de cuatro a cinco meses, con tasas de supervivencia global a 1 año de solo 10%. (2)

### **Factores de riesgo**

El 85 -90% de los cánceres de pulmón se asocia a pacientes con antecedentes de tabaquismo, la mayoría activo pero también en aquellas personas con tabaquismo pasivo. El riesgo relativo de cáncer de pulmón en fumadores es de 11 a 17 veces mayor comparado con los no fumadores. La relación es dependiente de la cantidad de cigarrillos fumados al día y de los años de tabaquismo. El dejar de fumar produce una disminución en el riesgo de adquirir cáncer de pulmón. (3-5)

La exposición a asbesto (material utilizado en diferentes industrias) aumenta el riesgo de adquirir cáncer de pulmón, en especial en las personas fumadoras, en quienes la exposición a este agente pareciera tener un efecto promotor tumoral. Por un lado, el fumar prolonga la presencia de la interacción asbesto- epitelio

pulmonar al alterar la eliminación bronquial; además el asbesto aumenta el potencial carcinogénico del tabaquismo. De tal forma que la exposición a asbesto se ha asociado a cáncer de pulmón con un riesgo relativo de 1.4 a 2.6, sin embargo cuando se combinan la exposición a asbesto y el tabaquismo, el riesgo relativo de cáncer de pulmón se incrementa hasta a un 28.8. (6-7)

Otros factores de riesgo estudiados, pero con un nivel de evidencia no tan contundente, incluye la exposición a arsénico, cromo, éter e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Enfermedades pulmonares como tuberculosis, silicosis y fibrosis pulmonar también han sido asociadas.

### **Fisiopatogenia y alteraciones genéticas en cáncer de pulmón.**

La carcinogénesis pulmonar es proceso crónico que involucra múltiples alteraciones genéticas, celulares y tisulares que, en su gran mayoría, son el resultado de un daño mutagénico en ciertos genes reguladores del crecimiento, diferenciación y la apoptosis (muerte celular programada), permitiendo la serie de etapas que definen a un cáncer caracterizadas por proliferación celular descontrolada, neoplasia, invasión, angiogénesis y metástasis.

Los eventos específicos que desencadenan esta transformación maligna de las células bronco-epiteliales son desconocidas en la gran mayoría de los casos. Sin embargo, es clara que la exposición ambiental a ciertos carcinógenos, como los producidos por el humo de tabaco y las fibras de asbesto, inducen y facilitan la transformación maligna (componente extrínseco). (8)

La contribución de los carcinógenos extrínsecos en la transformación de las células es modulada por la expresión de diversos genes (componente intrínseco) que afectan el metabolismo de los carcinógenos, como la conversión de pro-carcinógenos a carcinógenos y su subsecuente inactivación. (9) La frecuencia de estas variaciones genéticas en nuestra población es relativamente alta. Su contribución individual para desarrollar cáncer de pulmón es generalmente baja, pero debido a su frecuencia poblacional, su impacto global podría ser muy alto.

Algunos estudios epidemiológicos sugieren una predisposición familiar para cáncer de pulmón, independiente de la exposición al humo del tabaco. Mientras que un estudio encontró evidencia de un modelo autosómico dominante ligado al 6q23-q25, (10) otros estudios han propuesto modelos multigenéticos de riesgo. (11) Esta última teoría es actualmente la mayormente aceptada, debido a la gran cantidad de alteraciones genéticas que presentan los diferentes tipos de cáncer y en especial el cáncer de pulmón, como mencionaremos más tarde.

### **Alteraciones genéticas en cáncer de pulmón**

Los factores de riesgo ambientales (tabaquismo, asbestosis, etc;), modificados por genes moduladores, afectan otros genes que disregulan importantes vías de señalización, ocasionando un desequilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis.

Múltiples anormalidades genéticas han sido identificadas en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, sin embargo, no todas han tenido implicaciones clínicas. Los genes que afectan el riesgo y la evolución del cáncer de pulmón pueden categorizarse en tres rubros: variantes de alto riesgo raras (riesgo relativo de 10 o mayor con prevalencia de 1% o menos), variantes de riesgo moderado (riesgo relativo alrededor de 2-5 y prevalencia no más de 5%) y variante de bajo riesgo frecuentes (riesgo relativo entre 1.1 y 1.5 y prevalencia de más del 5%). Otros tipos de variante genéticas no parecieran existir, probablemente debido a la presión evolutiva (ej: variantes comunes de riesgo alto) ó son indetectables por los estudios ahora publicados (ej: variantes raras de bajo riesgo).

Las mutaciones genéticas de alto riesgo que tiene asociación con el cáncer de pulmón incluyen las mutaciones en TP53 en familias con síndrome de Li-Fraumeni. El Consorcio de Epidemiología Genética en Cáncer de Pulmón reportó en 52 familias tres o más casos de cáncer de pulmón y laringe e identifico una región cromosómica en el locus 6q23-25, posteriormente se pudo identificar el

gen RGS17 como el responsable de dicho cáncer familiar, sin embargo no se ha podido dilucidar el efecto funcional preciso del gen.

Existen otros 2 genes importantes debido a su asociación con cáncer de pulmón. El primero es el gen de la glutatión S transferasa M1 (GSTM1), un gen detoxificador de carcinógenos ambientales, asociado también con cáncer de vejiga y con los carcinógenos del tabaco. El segundo, una variante de CHEK2, un gen controlador del ciclo celular que activa los puntos de control en respuesta al daño en el DNA, a cáncer de colon, mama, próstata y pulmón.

Existen otra anomalías genéticas adquiridas de novo que influyen en el cáncer de pulmón, las más reconocidas son las alteraciones de RAS, Rb, Tp53, Akt, LKB, y BRAF. (12) Sin embargo, la anomalía genética adquirida clínicamente más relevante es la mutación de EGFR. (13-16) Estas son mutaciones en los exones 19 (deleciones en cuatro aminoácidos, LREA) y 20 (mutaciones puntuales L858R9) que resultan en la activación de la vías de señalización de AKT, inhibiendo la apoptosis y aumentando la proliferación celular.(17) Interesantemente, casi todas estas mutaciones ocurren en no-fumadores y en adenocarcinomas. (18, 19) Las respuestas de estos pacientes a los inhibidores tirosin cinasa (erlotinib y gefitinib) generalmente son muy buenas, incluso en pacientes previamente tratados y no respondedores a la quimioterapia convencional. Sin embargo, casi todos estos pacientes desarrollan resistencia y progresión eventualmente; la mitad de estos pacientes tiene una segunda mutación T790M asociada con resistencia. (20,21)

Por último, está claro que la gran mayoría de los cánceres de pulmón no están causados por un solo gen aberrante, pero no todas la aberrancias son debidas a mutaciones.

Diversos grupos de genes regulan el fino equilibrio entre el crecimiento normal, apoptosis y diferenciación. Este equilibrio puede ser alterado en diferentes puntos. Un ejemplo es la mutación de Rb y la pérdida de p16, un regulador de la función de Rb (gen del retinoblastoma), que en el cáncer de pulmón de células no

pequeñas, esta alteración puede ocurrir por cualquiera de los mecanismos, pero nunca por los dos.

### Factores pronósticos clínicos

Durante décadas se han intentado identificar los factores mal pronóstico, tanto para supervivencia como para respuesta al tratamiento, varios de ellos son clínicos y no demuestran exactamente la probabilidad de responder a las terapias actuales. Los factores de mal pronóstico identificados son:

- a) Tamaño tumoral: Se ha demostrado una relación directamente proporcional entre el tamaño tumoral y la posibilidad de presentar metástasis al diagnóstico. De tal forma que un tumor de 2 cm de diámetro tiene un 14% de posibilidades de tener metástasis, comparado con tumores de 6 cm, quienes presentan metástasis hasta en un 75% ( $p=0.002$ ) (22)
- b) Género: Se ha propuesto originalmente que los pacientes hombres con cáncer de pulmón tiene peor pronóstico que las mujeres. Sin embargo en análisis multivariados esta asociación resulto no ser significativa, y pareciera ser una asociación directa al tabaquismo (en diferentes cohortes se encontró que las mujeres fumaban menos que los hombres).
- c) Tabaquismo activo: El tener cáncer de pulmón y continuar fumando disminuye las posibilidades de respuesta y la supervivencia global. (23)
- d) Estirpe histológica: Se han asociado a las estirpes de adenocarcinoma y células grandes a mayor posibilidad de presentar metástasis al diagnóstico, lo que implica peor pronóstico, (58% vs 20 %,  $p=0.001$ ) comparado con epidermoides. (24)
- e) Edad: Los pacientes menores de 60 años tienen peor pronóstico que los pacientes mayores de 60 años. (25) Recientemente se demostró mayor asociación de mutaciones en el receptor de factor de crecimiento epidermoide (EGFR) en los pacientes jóvenes, en especial mujeres, el cual es un factor de mal pronóstico (antes del desarrollo de antineoplásicos contra EGFR).

- f) Niveles de antígeno carcinoembrionario (ACE): El grupo de trabajo del Dr. Arrieta (tutor de esta maestría y protocolo) demostró mayor riesgo de metástasis en pacientes con ACE mayores de 40ng/ml con un riesgo relativo de 11.4 ( $p = <0.001$ ) (26)

### **Perfiles genéticos y técnica de microarreglos**

Los perfiles genéticos en oncología, han sido usados para predecir pronóstico y respuesta al tratamiento. La valoración genética de los tumores ha tenido mayor importancia debido a que la clasificación histológica e incluso el estadio del tumor son insuficientes para predecir respuesta al tratamiento, recaída tumoral después de tratamiento quirúrgico con intento curativo ó supervivencia global en cáncer de pulmón. Muchas terapias actuales, estándares de tratamiento, como la terapia adyuvante en etapas II y III de CPCNP tienen la desventaja de que un gran número de pacientes reciben tratamiento innecesario debido a que no tenemos forma de predecir recaída.

Por esa razón, el beneficio de una terapia adyuvante se limita al 5-15% de todos los pacientes. (27-28) Hemos descubierto que la expresión de ciertos genes ó la presencia de ciertas mutaciones genéticas tiene implicaciones pronosticas y de respuesta a una terapia específica. La mutación de EGFR y la respuesta a inhibidores tirosin-cinasa, como mencionamos previamente, es un buen ejemplo de esto. Sin embargo, también sabemos que solo el 10% de los pacientes se beneficia de este tratamiento. (29,30,31)

Los perfiles de expresión genética representan otra alternativa en esta forma de investigación oncológica, generando una estrategia más comprensiva e individualizada. Quizás la evaluación de un patrón genético global pueda ser un mejor factor predictor que un análisis genético individual. Por ejemplo, Jones y cols utilizaron la técnica de microarreglos de DNA para analizar perfiles de expresión genética en 38 especímenes resecados de carcinoma neuroendocrino de células grandes de pulmón y en 11 tumores de células pequeñas. (32) Los autores reportaron que eran incapaces de identificar las diferencias histológicas

mediante perfiles genéticos, pero encontraron dos grupos de genes con diferencias significativas en supervivencia a 5 años (83% vs 12%  $p= 0.0094$ .)

Una de las áreas de mayor controversia en cáncer de pulmón es el tratamiento óptimo para pacientes con CPCNP en estadios tempranos. Los perfiles de expresión genética basada en microarreglos (PEG; una técnica genómica disponible) han sido estudiados en este tipo de pacientes. Estudios “clásicos”, como el hecho por Potti y cols, quienes mediante PEG, predijeron el riesgo de recurrencia después de cirugía de una cohorte de pacientes con CPCNP en estadios tempranos. (33)

La exactitud fue de más del 70%. Los investigadores también pudieron identificar un subgrupo de pacientes en estadio IA con un mayor riesgo de recurrencia, con una pobre supervivencia, y quienes eran candidatos a quimioterapia adyuvante. El perfil genético predijo recurrencia mejor que los factores pronósticos clínicos.

Otro estudio importante es el realizado por Tomida y cols, quienes desarrollaron un grupo de genes clasificadores de un total de 8644 genes analizados en 50 casos de CPCNP. (34) La clasificación resultante permitió predecir la supervivencia. Beer y cols analizó el perfil genético de 86 pacientes con adenocarcinoma primario de pulmón. (35) Los genes mayormente asociados con la supervivencia fueron identificados para crear un índice de riesgo basado en 50 genes que permitía separar a los pacientes en grupos de alto y bajo riesgo. Cuando aplicaron este modelo a 62 pacientes en estadio I de otro estudio, pudieron predecir la supervivencia con diferencias significativas entre ambos grupos ( $p= 0.006$ ). Este estudio también identificó pacientes en estadios I-III con pobre pronóstico, demostrando que mediante PEG es posible identificar a los pacientes con mal pronóstico independientemente del estadio al momento del diagnóstico. Observaciones similares fueron publicadas por Guo y cols, quienes crearon un modelo computacional capaz de predecir la evolución clínica individualizada de los pacientes basada en PEG. (36) Una “firma genética” de 37 genes fue creada basada en 86 pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Esta firma genética fue aplicada a otros 84 pacientes con adenocarcinoma. La exactitud

de predicción de la firma genética fue del 96%. El análisis de conglomerados, usando la firma de 37 genes, permitió separar a los pacientes en tres grupos: buen pronóstico (supervivencia media de 66.9 meses), moderado pronóstico (supervivencia media de 27.6 meses) y pobre pronóstico (supervivencia media de 22.4 meses).

Cuando los resultados fueron revisados, todos los pacientes agrupados en el conglomerado I (buen pronóstico) tenían enfermedad estadio I. Estos resultados demostraron que los modelos predictivos basados en los niveles de expresión de un número pequeño de genes marcadores pueden potencialmente predecir la evolución de los pacientes, y teóricamente representar el tratamiento personalizado.

### **Generalidades de Tratamiento**

Existen varios esquemas de quimioterapia aceptados para el tratamiento de primera línea de pacientes con CPCNP. La mayoría de los oncólogos optan por usar combinaciones (dupleta) basadas en platino (cisplatino ó carboplatino). (47-49) Sin embargo las tasas de respuesta oscilan entre 28 y 40%, con supervivencias medianas entre 9 y 12 meses, 4 a 6 meses más que el mejor cuidado de soporte.

También existen combinaciones útiles sin platinos. Un meta-análisis investigo la supervivencia a un año usando los datos obtenidos de 37 estudios aleatorizados fase II y III que compararon esquemas basados en platino versus quimioterapia sin platino. (50) El análisis encontró que la quimioterapia basada en platino se asociaba a un incremento del 62% en la respuesta (OR, 1.62; 1.46–1.8;  $P < 0.0001$ ) y un 5% en la supervivencia a un año (34% vs. 29%; OR, 1.21; 1.09–1.35;  $P = 0.0003$ ).

Sin embargo cuando se excluyeron los estudios con monodroga no se encontró diferencia significativa entre ambos tipos de esquemas (36% vs. 35%, OR, 1.11; 0.96–1.28;  $P = 0.17$ ). Debido a una mayor tasa de respuesta con las dupletas

basada en agente platinado, la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) recomienda su uso como primera línea de tratamiento.

### **Nuevas opciones de tratamiento basados en alteraciones genéticas**

Recientemente se ha demostrado que subtipos específicos de cáncer de pulmón de células no pequeñas pueden tener ciertas mutaciones genéticas que modifican y desregulan las vías de señalización, aumentando así la proliferación celular maligna del tejido pulmonar. Dichos cambios genéticos también tienen implicaciones clínicas; con valor pronóstico y predictor de respuesta a determinados tratamientos.

Dos alteraciones genéticas son especialmente importantes en la actualidad. La primera de ellas, son las mutaciones en los exones 19 y 21 (deleción del exón 19 y mutaciones puntuales en el exón 21 L858R) del receptor factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR 1)). Dicho receptor, de tipo tirosín cinasa, al ser estimulado activa las vías de señalización conocidas como PI3K/AKT y MAP cinasa, principales cascadas de señalización productoras de proliferación y supervivencia celular. La activación aberrante de estas dos vías de señalización secundaria a las mutaciones de EGFR han sido identificadas en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas de histología no epidermoide.

Erlotinib y gefitinib, ambos inhibidores de tirosín cinasa, han demostrado su actividad contra CPCNP. Inicialmente aprobados como tratamiento de segunda y tercera línea tras progresión a quimioterapia (independientemente de la histología y de la presencia de la mutación), son actualmente el tratamiento de elección como monodroga en primera línea en pacientes con tumores de histología no epidermoide y con la mutación de EGFR. En los estudios que se ha comparado alguno de estos inhibidores tirosín cinasa contra quimioterapia, erlotinib y gefitinib han demostrado mayores tasas de respuesta y han aumentado la supervivencia libre de progresión hasta en un 50% (riesgo relativo). (51)

La segunda alteración genética de importancia es la translocación del gen de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK). Dicha translocación se traduce en una fusión

aberrante EML4-ALK que codifica una proteína quimérica con actividad cinasa. Esta fusión se encuentra en 2-7% de los CPCNP. Crizotinib es un inhibidor selectivo de ALK y MET, su uso clínico se asoció a tasas de respuesta de 57%, con 33% de enfermedad estable y supervivencia libre de progresión a 6 meses del 72%. (52)

Un estudio multicéntrico demostró que el uso del microarreglos genéticos (15 genes) puede identificar a los pacientes con CPCNP en enfermedad temprana (estadios I y II) que se benefician del tratamiento quimioterapéutico adyuvante con 4 ciclos de cisplatino más vinorelbine, traduciéndose en un aumento de la supervivencia (HR 15.02; 5.12 - 44.04; P =.001; estadio I HR 13.31; P =.001; estadio II HR 13.47; P =.001). (53)

Un segundo estudio demostró en pacientes con enfermedad avanzada que, ciertos polimorfismos en dos genes reparadores de DNA (hMSH2 y hMLH1) se asocian a mayor respuesta tumoral a la quimioterapia. (54) Otros genes como el ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1), (55) miR-181 y miR-630, (56) pudieran asociarse a mayor respuesta a los platinos.

Se han desarrollado técnicas de búsqueda de arreglos de polimorfismos de nucleótido-único para analizar la pérdida o ganancia del material genético en alta resolución, (57, 58) capaces de encontrar mutaciones en el cáncer de pulmón. Las mutaciones no son las únicas alteraciones genéticas capaces de causar o alterar el comportamiento del cáncer de pulmón; la expresión de proteínas y por la tanto su función pueden ser alteradas por cambios epigenéticos. (59) La detección de metilaciones en promotores específicos pueden ser un biomarcador útil de malignidad. (60) Estas alteraciones en las vías de señalización son detectables en análisis de expresión genética, expresión de proteínas y cambios post-traduccionales (ej: fosforilación).

Diversos estudios se han realizado con el fin de identificar distintos subgrupos pronósticos de adenocarcinomas de pulmón utilizando la técnica de análisis de

microarreglos de ADN (61,62) e identificar pacientes con mayor probabilidad de recurrencia tras una resección quirúrgica. (33,63)

Algunos otros estudios se han enfocado en predecir la respuesta a las terapias actuales, por ejemplo, un estudio demostró que la baja expresión de un gen reparador del ADN llamado ERCC1 Correlaciona con pobre pronóstico en CPCNP, pero con mayor respuesta a los agentes platinados.(39)

Entender la biología molecular, descubrir y validar biomarcadores predictores de recaída, respuesta a tratamiento y pobre pronóstico nos permitirá crear guías de tratamiento óptimo para el tratamiento de los pacientes, de tal forma que esta terapia sea individualizada por las características fenotípicas y genotípicas del tumor.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Identificar los genes más relevantes que se expresan diferencialmente y que están relacionados con la respuesta tumoral al platino en pacientes con CPCNP

### **Otros objetivos**

- Comparar el patrón de expresión genética obtenido de los tumores primarios de pacientes con y sin respuesta a los agentes platinados.
- Buscar entre los genes identificados, aquellos cuyos productos sean secretados, para plantear a futuro su oportuna detección como biomarcadores de respuesta.
- Determinar las diferencias en supervivencia global y supervivencia libre de progresión entre los diferentes perfiles genéticos determinados.

## **HIPOTESIS**

Un perfil genético específico se asocia con la mayor o menor posibilidad de responder a un tratamiento de primera línea con quimioterapia basada en platino

en pacientes con CPCNP en estadios avanzados, de tal manera que identificar dicho perfil genético permitiría predecir la respuesta a agentes platinados y dar un tratamiento de manera individualizada.

## **Material y Métodos.**

### **Tipo de estudio y lugar de elaboración**

Se planea un estudio de cohorte, clínico, longitudinal, prospectivo, observacional y analítico, de pacientes consecutivos de la clínica de cáncer pulmonar tratados del 1º de marzo de 2013 al 30 de junio de 2014. Este estudio se realizará en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) con la colaboración del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El INCAN colaborará con el reclutamiento de pacientes, selección de ellos y las instalaciones necesarias para la investigación. El INMEGEN dará asesoría sobre el manejo del material necesario para la obtención y análisis de los microarreglos y perfiles genéticos.

### **Población a estudiar**

Se planea incluir a todos los pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas (estirpe histológica: adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y de células grandes) que se encuentren en estadios avanzados (estadios IIIB y IV) que sean candidatos a recibir tratamiento activo de primera línea con quimioterapia basada en platino.

### **Criterios de inclusión**

Cualquier género. Edad mayor de 18 años. Historia clínica completa. Reporte histopatológico de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Celularidad en tejido mayor de 70%. Estadio determinado por TAC o PET-CT como IIIB o IV según TNM. Estatus funcional >80% por Karnofsky ó catalogado como <3 por ECOG. Tratamiento activo de primera línea con quimioterapia basada en platino. Consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión**

Edad menor de 18 años. Cáncer de pulmón de células pequeñas. Cáncer de pulmón con estirpe neuroendocrina o sarcomatoide. Mal estatus funcional definido

como <80% por Karnofsky ó >2 por ECOG. No candidato a quimioterapia paliativa a base de platino. Rechazo del paciente para incluirse en el estudio. Material de biopsia insuficiente o de mala calidad para la realización del estudio.

### **Tamaño de la muestra estimada**

En estudios de pacientes con CPCNP en etapas tempranas, se han estudiado de 20-35 pacientes por grupo para analizar diferencias que sean estadísticamente significativas en la expresión de microarreglos para definir grupos de mayor o menor riesgo de recurrencia. Dado que en la literatura médica no existen trabajos previos en donde se busque identificar los perfiles genéticos como predictores de respuesta en cáncer de pulmón etapas avanzadas, y basándonos en las guías MIAME (**M**inimum **I**nformation **A**bout a **M**icroarray **E**xperiment) (20-25 pacientes por grupo para encontrar diferencias significativas). Que dictan la mínima información requerida para reportar estudio con microarreglos se consideró una muestra de 55 pacientes suficiente para realizar el análisis estadístico con un adecuado poder.

### **Variables a estudiar**

#### **1. Variables independientes:**

- a. Exposición a humo de leña
- b. Exposición a tabaquismo

#### **2. Variables Dependientes:**

- a. Expresión de genes en pacientes con adenocarcinoma pulmonar (asociados a la respuesta a platinos)

#### **3. Variables potencialmente confusoras:**

- a. Edad
- b. Género
- c. Estado Funcional (ECOG)
- d. Intensidad de tabaquismo (índice tabáquico)
- e. Intensidad de exposición a humo de leña
- f. Mutaciones: EGFR, ALK, K-RAS

## Definiciones:

- Progresión: Aumento mayor del 20% en el tamaño tumoral medido por tomografía axial computarizada, tomando como referencia la lesión medible más pequeña en el estudio inicial.
- Respuesta parcial: Disminución mayor del en el tamaño tumoral medido por tomografía axial computarizada, tomando como referencia la lesión medible más pequeña en el estudio inicial.
- Respuesta completa: Desaparición de toda lesión medible o no medible.
- Enfermedad estable: Paciente que no cumpla con los criterios antes establecidos.

## Obtención y almacenamiento de biopsias

El procedimiento para la toma de biopsia dependerá de las características del paciente y del tumor. La obtención de la biopsia podrá ser con aguja tru-cut guiada por tomografía, por toracoscopia abierta o video-asistida o por broncoscopia con fibra óptica. Cada muestra tumoral se dividirá en 2, una será enviada al departamento de Patología del INCAN para su diagnóstico histológico y la otra será almacenada inmediatamente a  $-70^{\circ}$  C bajo estrictas condiciones que preserven el tejido para la estabilización y posterior obtención del RNA (RNA Later). Los ácidos nucleicos (RNA) lo emplearemos posteriormente, para la determinación del perfil de expresión genética de los pacientes con CPCNP primario que desarrollen enfermedad metastásica al sistema nervioso central.

El análisis estadístico preliminar se realizará utilizando la t de Student o la U de Mann-Whitney, la prueba de Chi cuadrada ó la prueba exacta de Fisher; concluido el estudio se realizará análisis multivariado de regresión logística. El tiempo de supervivencia global y tasa de respuesta será analizado con la técnica de Kaplan-Meier, las comparaciones entre grupo serán con la prueba de log-rank.

## Extracción e integridad del RNA

Se extrajo el RNA de 29 biopsias de CPCNP con celularidad  $>70\%$  utilizando el RNAeasy MicroKit (Qiagen) con lo que obtuvimos la cantidad y calidad de RNA necesaria para el estudio de microarreglos de expresión genómica. Para ello, se

evaluó la integridad y concentración del RNA de éstas 29 biopsias utilizando un Bioanalizador Agilent 2100.

### **Microarreglos de expresion genomica**

La plataforma que se utilizó para evaluar la expresión génica fue la **Microarray Affimetrix Human ST 1.0** que nos permite identificar el 99.9% de los genes conocidos en las secuencias de Genbank. Esta plataforma de expresión genética permite evaluar 28,869 genes humanos. Cada gen está asociado a 26 sondas diferentes en el microarreglo. La suma de las intensidades de fluorescencia de cada exón acoplado a una sonda por celda generará la información de expresión genómica para ése gen en particular. El fundamento básico de éste procedimiento es la hibridación complementaria y antiparalela de los ácidos nucleicos que conforman al chip (DNA ó cDNA) y la muestra de estudio previamente acoplada a biotina-fluoróforo. Los datos de fluorescencia relativa para cada uno de los genes en todos los microarreglos se obtienen utilizando el escáner de alta fluorescencia y lo datos que se obtienen se almacenan en archivos de intensidad por celda/sonda (.cel files).

### **Expresion genomica: analisis computacional**

Para el análisis computacional se evaluaron los datos de los archivos de intensidad de fluorescencia (.cel files) para cada uno de los 29 microarreglos de expresión. Los datos se evaluaron de la siguiente manera:

1. Control de calidad de los Microarreglos: Análisis de los datos crudos. Corrección de Fondo (Hibridación Inespecífica) y Normalización de datos. Ambos estadísticos permiten que los datos se hagan comparables entre sí. La información que generan permite que la información biológica sea robusta y evite al máximo las variaciones dadas por las réplicas técnicas.
2. Elaborar los estadísticos de clasificación para los atributos de estudio (Mets/NoMets). Los estadísticos permiten generar información estadísticamente relevante (p value), diferencias en las tasas de cambio en la expresión génica (Fold Change) y niveles de confiabilidad (95%) en las tasas de cambio en la expresión genómica (Estadístico B).

3. Elaboración de mapas de calor. Análisis de grupos de genes. Este gráfico nos permite realizar similitudes entre grupos de estudio y niveles de expresión relativa de genes.

## RESULTADOS

### Características clínicas y moleculares tabla

A partir de los datos generales de los pacientes que ingresaron al Protocolo de microarreglos (Tabla1) se realizó el análisis univariado de las características asociadas a la respuesta Vs no respuesta al tratamiento con platinos de los pacientes con CPCNP con celularidad mayor o igual al 70%. Establecimos ....

Tabla 1

CARACTERISTICAS CLINICO DEMOGRAFICAS DE LOS PACIENTES			
<b>Genero</b>	<b>Mujer</b> 36 (65.5%)	<b>Hombre</b> 19 (34.5%)	<b>Total</b> 55 (100)
<b>Edad (Media)</b>	55.1 años	59.8 años	
<b>Tabaquismo</b>	<b>Positivo</b> 28 (50.9%)	<b>Negativo</b> 27 (49.1%)	
<b>Humo de leña</b>	<b>Positivo</b> 27 (49.1%)	<b>Negativo</b> 28 (50.9%)	
<b>ACE</b>	<b>Mas 10</b> 26 (47.3%)	<b>Menos 10</b> 22 (40.0%)	<b>Desconocido</b> 6 (10.9%)
<b>Respuesta</b>	<b>RC + RP</b> 14 (25.5%)	<b>EE + PE</b> 23 (41.8%)	
<b>ECOG</b>	<b>0-1</b> 45 (81.8%)	<b>Más de 2</b> 10 (18.2%)	
<b>MUTACION</b>	<b>EGFR</b> 18 (32.7%)	<b>KRAS</b> 5 (9.1%)	<b>ALK</b> 3 (5.5%)
<b>HISTOLOGIA</b>	<b>ADENOCARCINOMA</b>	55 (100%)	
<b>EC</b>	<b>IV</b>	55 (100%)	
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>BASADO EN PLATINOS</b>	55 (100%)	

## Muestras analizadas

Se tomaron en total 486 biopsias de pacientes con sospecha de cáncer de pulmón de Febrero de 2012 a Junio de 2014. De estas 486 biopsias 252 correspondieron a CPCNP. El subtipo adenocarcinoma se reportó en 152 de las 252 biopsias y las 100 restantes pertenecieron a otros subtipos.

En las 152 biopsias con adenocarcinoma 82 tenían una celularidad > 60%, y de estos 82 biopsias 71 tenían un RIN > 7. Para el estudios se tomaron solo 60 biopsias de las 71 con RIN >7.

Para el análisis final se contaron solo con 55 muestras ya que 5 se eliminaron por lo siguiente: En 2 biopsias se reportaron con histología adenoescamosa, 2 con cáncer de mama y 1 con cáncer de endometrio. De estas 55 muestras solo 37 fueron objeto de valoración de respuesta a tratamiento con platino por tanto esta la n de estudio.

ANALISIS UNIVARIADO				
		Respuesta	No respuesta	p
Genero	Femenino	10	17	0.027
	Masculino	4	6	
Tabaquismo	Positivo	8	9	1.137
	Negativo	6	14	
ACE	Menos de 10	6	13	2.15
	Más de 10	7	9	
Humo de leña	Positivo	6	14	1.13
	Negativo	8	9	
ECOG	0-1	13	27	0.28
	Más de 2	1	2	
Mutaciones	EGFR	(+) 6	(+) 10	0.023
		(-) 8	(-) 12	
	ALK	(+) 3	(+) 0	5.14
		(-) 11	(-) 22	
	KRAS	(+) 1	(+) 3	0.365
		(-) 13	(-) 19	

### **Valores de Integridad del RNA.**

Los valores de integridad del RNA extraído de las 55 Biopsias de CPCNP con celularidad mayor o igual al 70% se evaluaron utilizando un sistema automatizado que extrae un algoritmo a partir del análisis densitométrico. Estos datos generan un electroferograma en donde el área bajo la curva de los trazos genera el dato de integridad. Los valores de integridad que se obtuvieron para el análisis de microarreglos oscilaron entre 6.90 y 8.30.

Imagen RIN

### **Control de Calidad (Corrección de Fondo y Normalización de Datos)**

Con la finalidad de obtener los mejores resultados en el análisis de datos sin perder información biológica relevante, se analizaron los estadísticos de corrección de datos (corrección de fondo y normalización de datos). Concluimos, que la variabilidad de los 55 datos normalizados no son diferentes de los datos no normalizados

Figura .

Pca

### **Clasificación de Estadísticos**

Se realizaron las tablas comparativas (Tabla ) en donde se establecieron los grupos de datos (archivos.cel) relacionados con respuesta y no repuesta a platinos. Se tomaron ambos grupos y se obtuvieron las listas de genes que presentaban cambios en su expresión. Se obtuvieron tasas de cambio de -1.6 a 1.6 encontrándose 67 genes. Con tasas de cambio de -1.8 a 1.8 se hallaron 15 genes y con tasas de cambio de -2 a 2 se encontraron 4 genes. Entre el atributo respuesta/no respuesta.

GENES ENCONTRADOS CON TASAS DE CAMBIO DE -2 A 2		
GEN ASIGNADO	SIMBOLO	TASAS DE CAMBIO
NM_002543	OLR 1	2.19
INTRON		
NM_003937	KYNU	2.15
NM_002630	PGC	-2.11

## DISCUSION

En el análisis variado se observó que los pacientes con respuestas al tratamiento con platinos son las mujeres si se compara el género. Además de los pacientes con buen ECOG y con mutación del EGFR.

Las listas de genes que presentaban cambios en su expresión. Se obtuvieron tasas de cambio de -1.6 a 1.6 encontrándose 67 genes. Con tasas de cambio de -1.8 a 1.8 se hallaron 15 genes y con tasas de cambio de -2 a 2 se encontraron 4 genes. Entre el atributo respuesta/no respuesta. Los cuatro encontrados fueron OLR-1, KYNU, PGC y un intron. Con estos datos buscaremos las funciones celulares y su incidencia en la carcinogénesis en cáncer de pulmón.

## **Bibliografía:**

- 1) GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cancer Information (12/9/2011)
- 2) Rapp E, Pater JL, Willan A, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer — report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1988;6:633-41.
- 3) Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 2009;15(18):5626-5645.
- 4) Garfinkel L, Silverberg E. Lung cancer and smoking trends in the United States over the past 25 years. *CA Cancer J Clin* 1991;41(3):137-145.
- 5) Bach PB, Kattan MW, Thornquist MD, et al. Variations in lung cancer risk among smokers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(6):470-478.
- 6) Mossman BT, Bignon J, Corn M, et al. Asbestos: scientific developments and implications for public policy. *Science* 1990;247(4940):294-301.
- 7) Levin SM, Kann PE, Lax MB. Medical examination for asbestos-related disease. *Am J Ind Med* 2000;37(1):6-22.
- 8) Schuller HM: Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:455-463.
- 9) Zienolddiny S, Campa D, Lind H, et al: Polymorphisms of DNA repair genes and risk of nonsmall cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27:560-567
- 10) Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, et al: A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23–25. *Am J Hum Genet* 2004; 75:460-474.
- 11) Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al: Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 2005; 37:1315-1316.
- 12) Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD: Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003; 58:892-900.

- 13) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350:2129-2139.
- 14) Ohm JE, Amann JM, Carbone DP: Acquired EGFR TKI resistance associated with mutation of the EGFR. *AACR Mtg Abstr* 2004; 45:570.
- 15) Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-1500.
- 16) Pao W, Miller V, Zakowski M, et al: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:13306-13311.
- 17) Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W: Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:7232-7241.
- 18) Huang SF, Liu HP, Li LH, et al: High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8195-8203.
- 19) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:339-346.
- 20) Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352:786-792.
- 21) Pao W, Miller VA, Politi KA, et al: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2:e73.
- 22) Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, Raftopoulos H: Clinical predictors of metastatic disease to the brain from

non-small- cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology* 2007, 242:882-888

- 23) Tsao AS, Liu D, Lee JJ, et al: Smoking affects treatment outcome in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2006; 106:2428-2436.
- 24) Shi AA, Digumarthy SR, Temel JS, Halpern EF, Kuester LB, Aquino SL: Does initial staging or tumor histology better identify asymptomatic brain metastases in patients with non-small cell lung cancer? *J Thorac Oncol* 2006, 1:205-210.
- 25) Carolan H, Sun AY, Bezjak A, Yi QL, Payne D, Kane G, Waldron J, Leigh N, Feld R, Burkes R, et al.: Does the incidence and outcome of brain metastases in locally advanced non-small- cell lung cancer justify prophylactic cranial irradiation or early detection? *Lung Cancer* 2005, 49:109-115.
- 26) Arrieta O, Saavedra-Perez D, Kuri R, Avilées-Salas A, Martínez L, Mendoza-Posada D, Castillo P, Astorga A, Guzmán E, De la Garza J: Brain metastasis development and poor survival associated with carcinoembryonic antigen (CEA) level in advanced non-small- cell lung cancer: a prospective analysis (Abstract). *BMC Cancer* 2009, 9:119
- 27) Arriagada R, Bergman B, Dunant A, et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:351-60.
- 28) Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2589-97.
- 29) Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7:719-27.
- 30) Shepherd F, Rodrigues-Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-32.

- 31) Rosell R, Taron M, Sanchez JJ, et al. Setting the benchmark for tailoring treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Future Oncol* 2007; 3:277-83.
- 32) Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, et al. Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet* 2004; 363:775-81.
- 33) Potti A, Mukherjee S, Petersen R, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:570-80.
- 34) Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* 2004; 23:5360-70.
- 35) Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8:816-24.
- 36) Guo L, Ma Y, Ward R, et al. Constructing molecular classifiers for the accurate prognosis of lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3344-54.
- 37) Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 2003; 22:2192-205.
- 38) Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-500.
- 39) Olausson KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355:983-91.
- 40) Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5240-7.

- 41) Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2286-91.
- 42) Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:4731-7.
- 43) Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2007; 2:e1129.
- 44) Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes. *J Clin Oncol* 2005; 23:6838-45.
- 45) Petty RD, Kerr KM, Murray GI, et al. Tumor transcriptome reveals the predictive and prognostic impact of lysosomal protease inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:1729-44.
- 46) Tsao MS, Zhu C, Ding K, et al. A 15-gene expression signature prognostic for survival and predictive for adjuvant chemotherapy benefit in JBR.10 patients. *J Clin Oncol* 2008; 26(15 suppl):399s (Abstract 7510).
- 47) Schiller JH, Harrington D, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002 Jan 10;346(2):92-8.
- 48) Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crinò L, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4285-91.
- 49) Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr, et al. 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 Jul 1;19(13):3210-8.
- 50) D'Addario G, Pintilie M, Leighl NB, et al. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol* 2005; 23:2926-2936.

- 51) Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol. 2011 Aug;12(8):735-42
- 52) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2010 Oct 28;363(18):1693-703.
- 53) Zhu CQ, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010 Oct 10;28(29):4417-24.
- 54) Cheng H, Sun N, Sun X, Chen B. Polymorphisms in hMSH2 and hMLH1 and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2010 May 15;42(5):311-7.
- 55) Li F, Sun X, Sun N, Qin S, Cheng H, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and clinical response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. Am J Clin Oncol. 2010 Oct;33(5):489-94
- 56) Galluzzi L, Morselli E, Vitale I, Kepp O, et al. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. Cancer Res. 2010 Mar 1;70(5):1793-803.
- 57) LaFramboise T, Weir BA, Zhao X, et al: Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. PLoS Comput Biol 2005; 1:e65.
- 58) Zhao X, Li C, Paez JG, et al: An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res 2004; 64:3060-3071.
- 59) Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 2002; 3:415-428.
- 60) Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, et al: Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. Clin Cancer Res 2005; 11:6505-6511.

- 61) Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al: Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8:816-824.
- 62) Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al: Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13790-13795.
- 63) Lu Y, Lemon W, Liu P-Y, et al: A gene expression signature predicts survival of patients with stage I nonsmall cell lung cancer. *PLoS Med* 2006; 3:e467. Hayes DN, Monti S, Parmigiani G, et al: Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. *J Clin Oncol* 2006; 24:5079-5090