

EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMA NO MICROCÍTICO PULMONAR

José Javier Gómez Román, Jorge Cuevas González, José Fernando Val Bernal. Dpto Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. Ana Rodríguez y David González. Genómica SAU. Madrid.

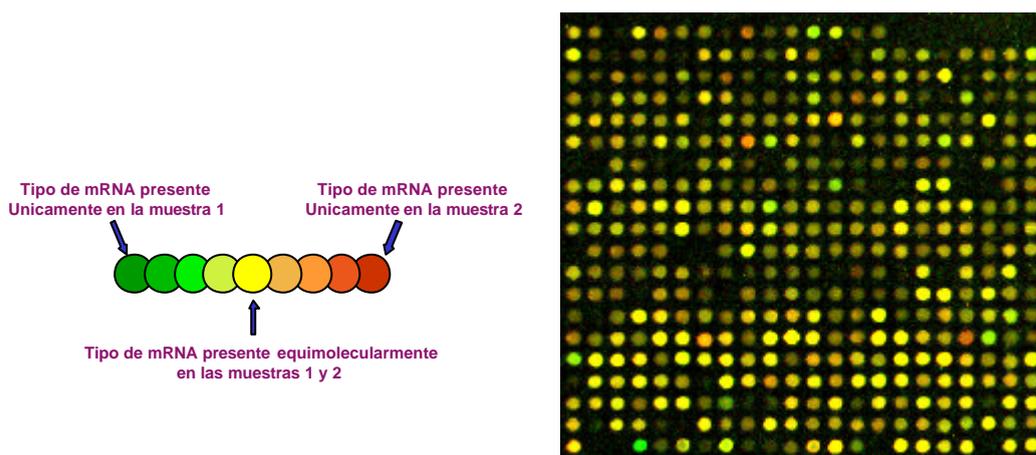
<mailto:apagrj@humv.es>

El cáncer es una enfermedad heterogénea en muchos aspectos, entre los cuales está el tipo celular implicado, las diferentes alteraciones genéticas que lo provocan o su diferente comportamiento clínico, incluso en casos diagnosticados en el mismo estadio clínico patológico. Un reto principal en el estudio y en el tratamiento del cáncer es la resolución de la heterogeneidad que existe tanto entre diferentes tumores como dentro de un solo tumor e intentar ofrecer mejores clasificaciones que estratifiquen a los pacientes de acuerdo con parámetros pronósticos y terapéuticos. En el examen de microscopía óptica convencional, que es el aplicado de forma rutinaria en todos los hospitales del mundo, se puede llegar a un grado de fiabilidad diagnóstica muy elevado a un precio muy asequible, con la dedicación de los especialistas en Anatomía Patológica. Así, obtenemos con la simple técnica del examen macroscópico, la inclusión en parafina y una tinción de rutina como la hematoxilina eosina, parámetros como el diagnóstico histológico (tipo tumoral), grado de diferenciación, extensión local de la enfermedad y a distancia mediante el examen de los ganglios linfáticos incluidos en la pieza quirúrgica. Podemos obtener asimismo otros factores de importancia pronóstica aplicando técnicas ya rutinarias en la mayor parte de hospitales como la inmunohistoquímica, hibridación in situ fluorescente (FISH) o técnicas básicas de patología molecular.

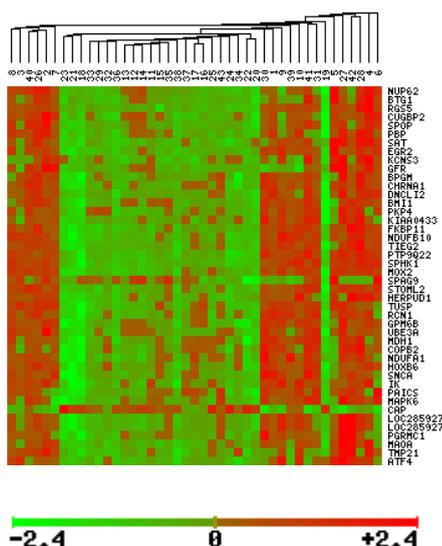
Ahora se plantea la utilización de técnicas de análisis masivo de expresión génica mediante aplicaciones moleculares importadas de otras disciplinas como la biología. Sin embargo, me gustaría reseñar aquí que hasta el momento, no han conseguido otra cosa que reproducir las clasificaciones que los patólogos realizan basándose en sus propios ojos y en las técnicas básicas. Existen datos en algunos tipos de neoplasias como los tumores mamarios y los linfomas que son prometedores, pero no debemos olvidar que para hacer un análisis de expresión génica masiva así como para cualquier tipo de técnica sofisticada molecular se precisa un enfoque racional que permita primero ofrecer un diagnóstico seguro, rápido y económico para ofertar posteriormente otros datos pronósticos con grandes implicaciones terapéuticas.

Los resultados que presentamos están basados en un proyecto colaborativo entre el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y la empresa Genómica SAU: “Desarrollo de marcadores y métodos diagnósticos de cáncer para pulmón basados en microarrays de cDNA”. El microarray utilizado está compuesto de clones de cDNA humanos procedentes de una librería comercial que contiene 9128 elementos (Human UniGene 1, Incyte Genomics), todos ellos con correspondencia comprobada con los clústeres UniGene. De estos clones, más de 6000 tienen una función bien definida, siendo el resto ESTs. Los cDNAs se depositan en portaobjetos utilizando un robot especializado (MICROGRID II, Biorobotics) distribuidos en 24 subarrays de 22 x 22 puntos, con una separación entre puntos de 0.2 μm . Cada subarray contiene 16 puntos de control, que se repiten 48 veces en el total del microarray. En cada microarray se comparó el perfil de expresión de la muestra problema, independientemente de que sea normal o tumoral, frente a una referencia de líneas celulares controles que permitieron normalizar los resultados cuantitativos que se obtienen de la hibridación. Por otro lado, se seleccionaron y validaron controles internos: genes cuyo número de expresión es relativamente estable en los diferentes tejidos y condiciones de ensayo (genes constitutivos).

En verde aparecen los genes cuyo mRNA es más abundante en la referencia y en rojo los mRNAs más abundantes en el tejido a estudio, mientras que aparecen en amarillo las cantidades de mRNA equivalentes en ambas condiciones.



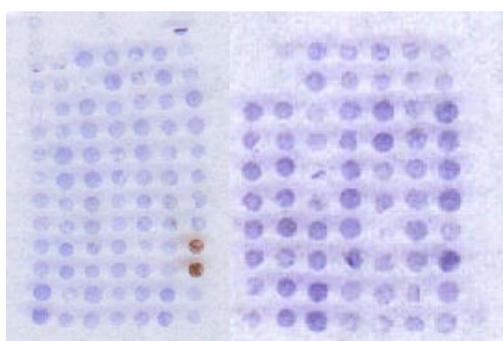
El proyecto se ha llevado a cabo sobre 43 muestras que pasaron el correspondiente control de calidad de RNA. Se han utilizado diversos procedimientos para estudiar *clústeres* de genes con expresión similar, de los que mostramos un



Por ejemplo, se ha descrito que la expresión de la proteína *heat shock* (HSP70) está asociada con adenocarcinomas y en nuestro estudio hemos identificado una sobreexpresión en el clúster correspondiente a los estadios IIB y IIIA.

A partir de los datos del estudio de expresión génica hemos identificado un grupo de 78 genes que son capaces de discriminar con un índice de seguridad cercano al 90% entre muestras pulmonares no neoplásicas y muestras neoplásicas. Por otro lado, hemos identificado un grupo de genes cuya expresión diferencial es indicativa de la estirpe histológica tumoral, con lo que queda abierto el camino a la profundización de las rutas moleculares implicadas en el desarrollo de tumores tempranos, y en la diferenciación histológica.

Todo estudio molecular de expresión génica debe llevar consigo una etapa de validación de los resultados. Esta validación se puede realizar de varias formas, comprendiendo métodos puramente moleculares como la RT-PCR cuantitativa a tiempo real para comprobación de niveles de expresión de mRNA, o puede pasar al terreno de las proteínas con la realización de estudios de inmunohistoquímica. En este sentido, de manera paralela a lo que ocurre con las técnicas moleculares, podemos evaluar la expresión proteica en cada caso de forma individual o podemos disponer de medios de evaluación masiva como son los Arrays tisulares (Tissue microarrays o TMA).



En la imagen podemos observar los TMAs correspondientes a los estadios I y II de carcinoma no microcítico pulmonar. Cada muestra tiene un diámetro de 0,6 cm y cada

ejemplo de clúster *jerárquico*, correspondiente a aquellos que aportan una clasificación basada en tipología de árbol binario o dan información sobre posibles relaciones jerárquicas entre los datos. En este ejemplo, cada fila corresponde a un gen y cada columna a uno de los casos estudiados.

La correlación de los datos obtenidos con los publicados en la literatura ha sido excelente, encontrando gran cantidad de los genes descritos previamente así como muchos otros no descritos.

caso se incluye por duplicado para evitar en lo posible los factores de heterogeneidad tumoral. En nuestro caso, hemos realizado TMAs de los diferentes estadios de carcinoma pulmonar no microcítico y de momento nos hemos centrado en los casos limitados al pulmón (estadios I y II, sobre un total de 90 casos con seguimiento clínico mínimo de 10 años) y al estudio de proteínas relacionadas con el ciclo celular cuya expresión de mRNA hubiera demostrado ser diferencial en el estudio de expresión génica.

Los datos de los TMA confirman los obtenidos en los microarrays de cDNA y amplían la información, demostrando que las proteínas p21^{waf1/cip1} y p27^{kip1} se encuentran alteradas en un porcentaje apreciable de carcinomas no microcíticos, mientras que la proteína p16^{INK4a} disminuye también de manera significativa.