



Anàlisi de polimorfismes d'una sola base (SNPs) com a factors predictius de recaiguda en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita quirúrgic

Marc Campayo Guillaumes

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Anàlisi de polimorfismes d'una sola base (SNPs) com a factors
predictius de recaiguda en pacients amb càncer de pulmó de
cèl·lula no petita quirúrgic**

Tesi presentada per
Marc Campayo Guillaumes
Per optar al grau de Doctor en Medicina

Codirectors: Dra. Nuria Viñolas Segarra i Dr. Alfons Navarro Ponz

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Desembre 2011

A la meva mare

A l'Alba

A en Martí

Agraïments

La realització d'aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense l'ajuda de moltes persones, a les que vull agrair el seu suport.

Al Prof. Mariano Monzó, per haver-me introduït en el món de la biologia molecular, pel seu continu entusiasme, suport i consell.

A la Dra. Nuria Viñolas, per haver-me donat l'oportunitat d'entrar al grup de Càncer de Pulmó. Per la seva ajuda durant la residència i en els moments més difícils. Gràcies pel teu suport permanent.

Al Dr. Alfons Navarro, per la seva amistat, pel seu estímulo, per la seva ajuda en tot moment i dedicació. Sense ell el projecte no hagués prosperat.

A tot el personal del Laboratori d'Oncologia Molecular. Per la seva paciència, per la seva ajuda i pels bons moments que hem passat.

Al Dr. Ramírez i al Dr. Marrades, per la seva ajuda, suport i entusiasme.

A tots els membres del Comitè de Càncer de Pulmó, per la seva col·laboració.

A tot el Servei d'Oncologia Mèdica, per haver-me acollit i per haver-me fet créixer com a metge.

A tots els pacients, per la seva col·laboració en la recerca.

A tots els mestres i professors, per tot el que m'han ensenyat i per haver-me transmès uns valors.

A l'Alba, pel seu recolzament en tot moment, pel seu ànim i per la seva paciència. Compartir la vida amb tu ho fa tot molt més fàcil.

A la meva mare, que ho ha donat tot pels seus fills. Gràcies per la teva generositat, el teu recolzament i optimisme.

Als meus germans, per haver-me fet de pares.

Un sincer agraïment a tots vosaltres.

Abreviatures

ABC: *ATP-binding cassette*

BaP: benzo[a]pirè

BER: *base excision repair*

CCG: carcinoma de cèl·lules grans

CPCNP: càncer de pulmó de cèl·lula no petita

DNA: *deoxyribonucleic acid*

ECOG PS: *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*

miR-SNP: SNP relacionat amb miRNAs

miRNA: microRNA

mRNA: RNA missatger

NER: *nucleotide excision repair*

PAH: *polycyclic aromatic hydrocarbon*

PET: *positron emission tomography*

PIC: *preincision complex*

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RNA: *ribonucleic acid*

SG: supervivència global

SNP: *single nucleotide polymorphism*

TC: tomografia computeritzada

TNM: *Tumor, Node, Metastasis*

TR: temps a la recaiguda

UTR: untranslated region

WT: *wild-type*

Nota: s'utilitzen alguns acrònims de l'anglès quan aquests estan àmpliament utilitzats en la literatura científica.

Abreviatures de gens i proteïnes:

4-ABP: 4-Aminobifenil

ABCB1: *ATP-binding cassette, sub-family B, member 1*

APC: *adenomatous polyposis coli*

CDC25A: *cell division cycle 25 homolog A*

CDH13: *cadherin 13, H-cadherin*

CDK6: *cyclin-dependent kinase 6*

CDKN2A (p16): *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)*

Cox-2: *ciclooxigenasa 2*

CYP: *familia de gens del citocrom P450*

CYP1A1: *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*

CYP2C8: *cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8*

DICER: *ribonuclease type III*

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

EH: *epoxide hydrolases*

EML4-ALK: *echinoderm microtubule associated protein like 4 - anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*

EPOXH1: *epoxide hydrolase 1, microsomal (EPHX1)*

ERBB2; Her- 2: *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*

ERCC1: *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*

FHIT: *fragile histidine triad gene*

GST: *glutathione S-transferase*

GSTM1: *glutathione S-transferase mu 1*

GSTT1: *glutathione S-transferase theta 1*

HGF: *hepatocyte growth factor*

HMGA2: *high mobility group AT-hook 2*

KRAS: *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

KRT81; Hb-1: *keratin 81*

MDR1: *multidrug resistance gene 1*

MET: *met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)*

MMP2: *matrix metalloproteinase 2*

MMP9: *matrix metalloproteinase 9*

MPO: *myeloperoxidase*

MYC: *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*

NAT: *N-acetyltransferase*

NAT2: *N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)*

NDMA: *N-nitrosodimethylamine*

NNAL-glucs: NNAL-glucuronids

NNAL: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol

NNK: *nicotine-derived nitrosamino ketone*

NNN: N'-nitrosornicotina

NOTCH: notch

NQO1: *NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*

OGG1: *8-oxoguanine DNA glycosylase*

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*

Pol δ/ϵ : polimerasa δ/ϵ

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

RAN: *RAN, member RAS oncogene family*

RASSF1A: *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1*

Rb: *retinoblastoma*

RB1: *retinoblastoma 1*

RFC: *replication factor C*

RPA: *replication protein A*

RRM1: *ribonucleotide reductase M1*

SHH: *sonic hedgehog*

SLITRK1: *SLIT and NTRK-like family, member 1*

TFIIH: *core transcription factor II H*

TIMP-1: *tissue inhibitor of metalloproteinase 1*

TP53: *tumor protein p53*

TTF1: *thyroid transcription factor 1*

UGT: *Uridina-5-difosfo-glucuronosil transferasa*

WNT: *wingless-type MMTV integration site family*

XPA: *xeroderma pigmentosum, complementation group A*

XPB: *xeroderma pigmentosum, complementation group B; excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (ERCC3)*

XPC: *xeroderma pigmentosum, complementation group C*

XPB: *xeroderma pigmentosum D; excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (ERCC2)*

XPF: *xeroderma pigmentosum, complementation group F; excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4 (ERCC4)*

XPG: *xeroderma pigmentosum, complementation group G, excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (ERCC5)*

XPO5: *exportin 5*

XRCC1: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1

ÍNDIX

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓ | 17 |
| 1. Generalitats del càncer de pulmó de cèl·lula no petita (CPCNP) | 17 |
| 1.1. Epidemiologia | 17 |
| 1.2. Etiologia | 17 |
| 1.3. Biologia | 19 |
| 1.4. Anatomia patològica | 21 |
| 1.5. Clínica, diagnòstic i estadiatge..... | 23 |
| 1.6. Tractament dels estadis localitzats | 27 |
| 2. Factors pronòstics en malaltia precoç | 29 |
| 2.1. Estadi | 29 |
| 2.2. Histologia..... | 29 |
| 2.3. Cirurgia | 29 |
| 2.4. Paràmetres dependents del pacient | 30 |
| 2.5. Marcadors moleculars..... | 31 |
| 3. Polimorfismes genètics | 33 |
| 4. Metabolisme dels carcinògens del tabac, reparació del DNA i MDR1..... | 37 |
| 4.1. Carcinògens del tabac | 37 |
| 4.2. Activació metabòlica i destoxicació dels carcinògens..... | 37 |
| 4.3. MDR1/ABCB1..... | 41 |
| 4.4. Reparació del DNA | 41 |
| 4.5. Polimorfismes en gens de metabolització del tabac, reparació del DNA i MDR1 i risc de càncer de pulmó. Paper pronòstic en malaltia localitzada. | 44 |
| 5. Generalitats sobre els miRNAs | 47 |
| 5.1. Introducció..... | 47 |
| 5.2. Biogènesi | 48 |
| 5.3. Funcions..... | 49 |
| 5.4. Mecanismes de desregulació dels miRNAs en càncer..... | 50 |
| 5.5. Paper dels miRNAs en CPCNP | 51 |
| 6. SNPs relacionats amb els miRNAs (miR-SNPs). | 55 |
| 6.1. Concepte..... | 55 |
| 6.2. Classificació dels miR-SNPs i paper pronòstic en càncer..... | 55 |
| II. HIPÒTESI I OBJECTIUS | 59 |
| III. PRIMER TREBALL..... | 61 |
| IV. SEGON TREBALL..... | 71 |
| V. DISCUSSIÓ | 83 |
| VI. CONCLUSIONS | 89 |

| | |
|--|------------|
| VII. BIBLIOGRAFIA..... | 91 |
| VIII. ANNEX..... | 109 |
| Material suplementari del primer treball | 109 |
| Material suplementari del segon treball | 110 |
| Altres treballs publicats durant el període de doctorat | 115 |

I. INTRODUCCIÓ

1. Generalitats del càncer de pulmó de cèl·lula no petita (CPCNP)

1.1. Epidemiologia

El càncer de pulmó és el tumor més freqüentment diagnosticat a nivell mundial si considerem conjuntament els dos sexes i és la primera causa de mort per càncer. En homes, la incidència més elevada la trobem a l'Europa central i de l'est, seguida per l'Amèrica del Nord. En dones, la incidència més alta és a l'Amèrica del Nord (1).

En els països desenvolupats, el càncer de pulmó ocupa el segon lloc en incidència de càncer en homes i la tercera en dones. Continua representant la primera causa de mort per càncer globalment, arribant fins al 19,9% del total de morts per càncer a Europa (2). Per sexes, és la primera causa de mort en homes i la segona en dones, pràcticament igualant el nombre de morts per càncer de mama (1).

La variabilitat existent en la distribució de la patologia segons les àrees geogràfiques i segons el sexe dintre d'aquestes àrees, reflecteix l'evolució que ha sofert el tabaquisme durant els últims 30 anys (3, 4). Mentre la mortalitat per càncer de pulmó en homes ha descendit a Europa, Amèrica del Nord i Austràlia, està augmentant a la Xina i en altres països d'Àsia i Àfrica, on l'hàbit tabàquic s'ha establert més recentment (5, 6). En dones, les taxes d'incidència i de mortalitat varien àmpliament segons la regió geogràfica i a Europa continuen pujant en alguns països .

Malgrat que els darrers anys hi ha hagut avenços en el coneixement de la malaltia i en el seu tractament, la taxa de supervivència als 5 anys no s'ha modificat i continua essent inferior al 15% en homes i al 18% en dones (3). Aquesta baixa taxa de supervivència fa que les xifres d'incidència i de mortalitat siguin similars per aquesta patologia (4).

1.2. Etiologia

Tabac

El consum de tabac és la principal causa del càncer de pulmó, estimant-se que fins un 90% de tots els casos són provocats per aquest hàbit (7). El tabac és a més la causa de fins el 30% de morts per càncer en els països més desenvolupats (8, 9). La possibilitat de que el tabaquisme fos la causa del càncer de pulmó ja va ser proposada el 1912 per Adler (10).

El risc en fumadors en relació al risc en no fumadors és de l'ordre de 8 a 15 vegades en homes i de 3 a 10 en dones. Factors que incrementen el risc de càncer de pulmó en fumadors inclouen la durada de l'hàbit tabàquic, el nombre de cigarretes fumades (dosi total acumulada) i l'exposició a altres factors carcinògens com l'asbest. El tabac augmenta el risc de tots els subtipus histològics predominants de càncer de pulmó, però sembla ser més fort pel carcinoma escamós, seguit del carcinoma de cèl·lules petites i de l'adenocarcinoma.

L'evidència que lliga el consum de tabac amb el càncer de pulmó està documentada per un gran volum de recerca retrospectiva i prospectiva. Primerament aquesta evidència era indirecta, però amb el descobriment de que el benzo[a]pirè (BaP), un carcinogen present en el fum del tabac, era capaç de causar danys específics en el gen p53 (11), que està alterat en el 60% dels casos de càncer de pulmó, es va establir una relació directa. Altres carcinògens del fum del tabac també semblen tenir com a diana (12) gens importants en la biologia del càncer de pulmó.

L'hàbit de fumar cigars també ha estat associat a un risc augmentat de desenvolupar càncer de pulmó, però el risc és menor que el del consum de cigarretes. L'ús de pipa també augmenta el risc de manera similar als cigars (13-16).

El risc de càncer de pulmó disminueix després del cessament de l'hàbit tabàquic de manera gradual durant els següents 15 anys, però el risc relatiu mai torna als nivells del d'un individu no fumador (17, 18).

Les propietats del tabac que són claus per a la carcinogènesi pulmonar son vàries. En primer lloc, la presència de carcinògens pulmonars en el fum del tabac, tant en la seva fase gasosa com en la seva fase de partícules. Són exemples de carcinògens presents en la fase gasosa el 1,3-butadiè, l'òxid d'etilè, el benzè i els aldehids. Alguns carcinògens de la fase de partícules són els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs, de l'anglès, *polycyclic aromatic hydrocarbons*) i les nitrosamines específiques del tabac. En segon lloc, agents químics presents en el fum del tabac que poden actuar com a promotors de tumors o cocarcinògens, o sigui, agents que no són carcinògens per si mateixos però que poden incrementar l'activitat dels carcinògens quan s'administren de manera conjunta. En últim lloc, altres components presents com alguns radicals lliures i oxidants són capaços de produir un dany oxidatiu en l'àcid desoxiribonucleic (DNA, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*)(19, 20).

Altres factors etiològics

A part del tabac, hi ha altres factors que augmenten el risc de desenvolupar càncer de pulmó. Primerament, varis tòxics ambientals com el radó, l'arsènic, l'asbest, el crom, el níquel, la radiació ionitzant o l'exposició al fum del tabac com a fumador passiu (21).

En segon lloc, algunes patologies, com és el cas de pacients afectes de fibrosi pulmonar, en qui el risc està incrementat i és independent del consum de tabac (22).

Finalment, hi ha condicions genètiques que poden augmentar el risc de càncer de pulmó. Es coneix que individus amb història familiar de la patologia tenen un risc incrementat de patir la malaltia (23, 24). També s'ha descrit un locus de susceptibilitat al càncer de pulmó en la regió 6q23-25 (25). Existeixen síndromes que confereixen un risc major de desenvolupar càncer de pulmó, com la síndrome de Li-Fraumeni, caracteritzada per l'existència de mutacions germinals en el gen *TP53* (26). Per concloure, destacar que existeixen determinats polimorfismes genètics en enzims de metabolització de xenobiòtics o enzims de reparació del DNA, que poden conferir un risc major de desenvolupar càncer de pulmó i aquest tema es tracta en un capítol posterior.

1.3. Biologia

El procés pel qual es desenvolupa un càncer està format per múltiples passos, durant els quals s'adquireixen unes capacitats biològiques que, conjuntament, alteren la fisiologia cel·lular i causen el creixement maligne observat. L'any 2000, Hanahan i Weinberg van descriure sis capacitats principals dels tumors malignes: el manteniment de la senyalització proliferativa, l'evasió de les senyals supressores del creixement, la resistència a la mort cel·lular, el potencial replicatiu il·limitat, la inducció de l'angiogènesi i l'activació de la invasió de teixits i de la metàstasi (27). Dues característiques subjacents a les prèvies són la inestabilitat genòmica, que aporta una diversitat genètica que accelera l'adquisició d'aquestes capacitats, i la inflamació, que promou varies de les capacitats descrites. A més, actualment també es reconeixen dues característiques afegides: la desregulació del metabolisme energètic cel·lular i l'evasió de la destrucció mitjançada pel sistema immunitari (28).

La transformació cap a un fenotip maligne de càncer de pulmó esdevé a través de múltiples passos produïts per l'acumulació d'una sèrie d'alteracions genètiques i epigenètiques en les cèl·lules de l'epiteli bronquial i pulmonar que finalment

portaran a la invasió tissular i a l'expansió clonal. La identificació d'aquests canvis moleculars és de vital importància per a poder avançar en el camp de la detecció precoç de la malaltia, el seu tractament, o quan sigui possible, la seva prevenció. Varis oncogens, gens supressors de tumors, components de vies de senyalització i altres processos cel·lulars estan implicats en la patogènia del càncer de pulmó. Revisarem els més importants a continuació.

La majoria de casos de càncer de pulmó esdevenen per mutacions adquirides causades per carcinògens ambientals, principalment del tabac. Però també hi ha alteracions genètiques hereditàries que confereixen una susceptibilitat individual a desenvolupar la malaltia. En aquest sentit, actualment es tendeix a considerar una malaltia diferent la que trobem en poblacions determinades de dones no fumadores amb adenocarcinoma, on trobem un patró diferent de mutacions de gens importants en càncer de pulmó com són *EGFR* i *KRAS* (29).

Les anomalies genètiques que causen la transformació maligna de la cèl·lula típicament tenen com a diana proto-oncogens (que amb la seva activació seran oncogens), gens supressors tumorals, gens de reparació del DNA i altres gens que poden promoure el creixement descontrolat (30).

L'activació oncogènica pot ser causada per una amplificació gènica, una mutació, una sobre-expressió o per altres mecanismes. Totes aquestes alteracions poden portar a un estímul del creixement cel·lular persistent i poden promoure la transformació maligna de la cèl·lula. Hi ha varis oncogens típicament activats en càncer de pulmó, dels que vull destacar *EGFR*, *ERBB2*, *MET*, *MYC*, *KRAS* i *EML4-ALK* (31). Un fet interessant és que quan hi ha una persistent sobre-regulació d'una via concreta, la cèl·lula es pot tornar dependent d'aquesta via per la seva supervivència i és quan parlem del fenomen de l'addicció oncogènica (32). Aquesta dependència de la cèl·lula la fa més vulnerable a un tractament que específicament pugui inhibir aquesta via de creixement. Dos exemples serien els fàrmacs que estan dirigits contra les proteïnes *EGFR* o *EML4-ALK*.

Un altre event comú en càncer de pulmó és la pèrdua de funció d'un gen supressor tumoral. Generalment és necessari que s'inactivin els dos al·lels perquè es doni aquesta pèrdua de funció. Així, és comú que un al·lel s'inactivi per pèrdua d'heterozigotitat, a través d'una translocació o deleció cromosòmica, i el segon al·lel s'alteri per una mutació o per un silenciament transcripcional o epigenètic. Exemples de gens supressors tumorals que estan comunament inactivats en càncer de pulmó son *TP53*, *RB1*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* i *PTEN* (31).

Un altre event que trobem precoçment en la carcinogènesi del càncer de pulmó és una hipermetilació aberrant del promotor de varis gens relacionats amb la supressió de tumors, la invasió tissular, la diferenciació, la reparació del DNA o la destoxicació de carcinògens, resultant en un silenciament d'aquests (33, 34).

A més d'aquesta regulació epigenètica, actualment també es coneix un mecanisme de regulació de l'expressió gènica a un nivell post-transcripcional, el qual serà tractat en un altre capítol, que és la regulació pels microRNAs (miRNAs).

Altres gens importants en càncer de pulmó són els relacionats amb les vies de senyalització involucrades en l'auto-renovació i el manteniment de les cèl·lules mare: *SHH*, *NOTCH* i *WNT*. En càncer freqüentment trobem mutacions en gens d'aquestes vies, que poden comportar la seva desregulació (35). És de vital importància conèixer aquestes vies de cara a poder desenvolupar estratègies terapèutiques més efectives en càncer, que tinguin com a diana les cèl·lules mare canceroses, que com es pensa, tenen un paper destacat en la progressió del càncer (36).

Finalment, també vull destacar que en més del 80% dels CPCNP observem una activació de la telomerasa, l'enzim que permet allargar els telòmers fent que la capacitat replicativa de les cèl·lules no estigui frenada per un escurçament d'aquests (37, 38).

1.4. Anatomia patològica

Aproximadament el 85% dels càncers de pulmó són CPCNP. Fins els anys 60, el tipus predominant era el carcinoma escamós. En els últims anys però, encara que la incidència global de CPCNP ha augmentat, la incidència relativa del carcinoma escamós ha disminuït i actualment el tipus de CPCNP més freqüent és l'adenocarcinoma. Aquest fenomen ha estat associat a canvis en el tipus cigarretes i en l'ús de filtres (39).

La classificació histològica de la OMS de l'any 2004 és encara la vigent actualment (40). No obstant, en una revisió de l'any 2011, s'ha revisat la classificació dels adenocarcinomes (41), amb algun canvi important com l'abandonament del terme adenocarcinoma bronquioloalveolar.

| CPCNP | | |
|--------------------|-------------------|------------------------------|
| Adenocarcinoma | Carcinoma escamós | CCG |
| Subtipus mixt | Papil·lar | CCG neuroendocrí |
| Acinar | Cèl·lules clares | Basaloide |
| Papil·lar | Cèl·lules petites | <i>Limfoepitelioma-like</i> |
| Bronquioloalveolar | Basaloide | Cèl·lules clares |
| Sòlid | | CCG amb fenotip basaloide |

Taula 1. Principals subtipus de CPCNP, adaptat de la classificació de la OMS del 2004, la utilitzada en la present tesi. CCG: carcinoma de cèl·lules grans.

Adenocarcinoma

És un tumor epitelial maligne amb diferenciació glandular o producció de mucina i que es pot presentar amb varis patrons histològics. Encara que la majoria es presenten en individus fumadors, aquest subtipus es desenvolupa més freqüentment que qualsevol altre en no fumadors, particularment en dones (42). Se sol localitzar a la perifèria dels pulmons i histològicament en les vies aèries petites. Són més difícils de detectar per citologia d'esput. La lesió precursora de l'adenocarcinoma s'ha postulat que és la hiperplàsia alveolar atípica (43).

Les característiques immunohistoquímiques poden variar segons el subtipus histològic o el grau de diferenciació. És típica l'expressió de marcadors epitelials citoqueratina AE1/AE3, citoqueratina CAM 5.2, antígen de membrana epitelial i antígen carcinoembrionari. La citoqueratina 7 s'expressa més freqüentment que la citoqueratina 20 (44). TTF1 és normalment positiu, especialment en els tumors més ben diferenciats (40, 45, 46).

Carcinoma escamós

És un tumor epitelial maligne que mostra queratinització i/o ponts intercel·lulars, que prové de l'epiteli bronquial. Aproximadament el 90% dels carcinomes escamosos esdevenen en individus fumadors (47). La majoria es troben en localització central al bronqui lobar o segmentari (48). És més fàcilment detectable per citologia d'esput.

Pel que fa a la immunohistoquímica, la majoria de carcinomes escamosos expressen predominantment queratines d'alt pes molecular (citoqueratina 34βE12), citoqueratina 5/6 i antígen carcinoembrionari, mentre que una minoria

expressen TTF1 (40, 49, 50). Molt recentment p63 s'ha erigit com un important marcador pel carcinoma escamós de pulmó (51).

Carcinoma de cèl·lules grans

Es tracta d'un CPCNP indiferenciat que no té característiques de cèl·lula petita o diferenciació glandular o escamosa. Alguns d'ells es re-classifiquen com a adenocarcinomes o carcinomes escamosos poc diferenciats si s'estudien amb més detall.

Carcinoma adenoescamós

És un tipus de carcinoma que mostra tant components de carcinoma escamós com components d'adenocarcinoma, amb cadascun d'ells representant almenys el 10% del tumor. Predominantment es troben a la perifèria del pulmó i clínicament es comporten més com un adenocarcinoma. No obstant, es tracta d'una entitat citogenètica diferent (52).

1.5. Clínica, diagnòstic i estadiatge

La presentació clínica del càncer de pulmó és molt variada i depèn de varis factors com són la localització del tumor primari, la seva extensió locorregional o a distància, la presència de patologies prèvies (com les relacionades amb el tabac) i el desenvolupament de síndromes paraneoplàsiques. Molts símptomes i signes no són específics de la malaltia: tos, dispnea, dolor toràcic, hemoptisi, pneumònia. Altres poden suggerir extensió locorregional o a distància: síndrome tòxica (astènia, anorèxia i pèrdua de pes), dolor ossi, disfàgia, alteracions neurològiques, ronquera, síndrome de la vena cava superior, síndrome de Horner, taponament pericàrdic, hepatomegàlia, adenopaties supraclaviculars. Podem també trobar altres signes i símptomes formant part de varies síndromes paraneoplàsiques sistèmiques, cutànies, neurològiques, metabòliques, renals i hematològiques. La presència d'una síndrome paraneoplàsica no necessàriament indica malaltia metastàtica (53).

Tots els pacients que es presenten amb sospita de càncer de pulmó han de tenir una història clínica i exploració física completes, amb important èmfasi en la detecció de comorbiditats importants i en la mesura de l'estat general de salut. A continuació s'hauran de dur a terme varies exploracions complementàries amb la finalitat d'estadificar la malaltia i obtenir mostra pel diagnòstic definitiu histològic. Primerament, una analítica amb hemograma, funció hepàtica i renal, fosfatasa alcalina, albúmina, calci i electròlits (54). Els marcadors tumorals sèrics han estat àmpliament estudiats en càncer de pulmó i s'han reportat diferències segons la

histologia, però la seva utilitat clínica no està encara ben establerta (55). La radiografia simple de tòrax és una prova senzilla i àmpliament accessible i pot ser en alguns casos de pacients asimptomàtics o en seguiment per altres patologies, la prova que ens fa sospitar de l'existència d'un càncer de pulmó. També ens pot mostrar la presència d'embassament pleural en algunes ocasions, tributari d'estudi per toracocentesi i anàlisi bioquímica i citològica del líquid. Tanmateix, la citologia d'esput pot resultar positiva en alguns casos de tumors centrals i és una tècnica no invasiva per al diagnòstic. La fibrobroncoscòpia resulta molt útil en el pacient amb sospita de càncer de pulmó ja que ens permet identificar en alguns casos una tumoració endobronquial, una compressió extrínseca bronquial o una infiltració submucosa. A més, ens permet obtenir un broncoaspirat i una biòpsia del tumor i dels ganglis afectes que ens proporcionarà el diagnòstic histològic. A tots els pacients s'ha de realitzar una tomografia computeritzada de tòrax (TC) i abdomen superior (incloent les glàndules suprarenals). Aquesta prova pot caracteritzar el tumor primari, definir la seva relació amb la paret toràcica o el mediastí, detectar adenopaties mediastíniques i lesions al pulmó contralateral o abdomen superior sospitoses de metàstasis. La TC ens pot servir també com a prova per a guiar una punció-aspiració amb agulla fina o una biòpsia percutània, que pot resultar útil sobretot en els casos de tumors perifèrics no accessibles per fibrobroncoscòpia.

Una vegada confirmat histològicament el càncer de pulmó, i en els casos en que es plantegi un tractament local radical, s'haurà de completar l'estadiatge amb la realització d'una ressonància cerebral i una gammagrafia òssia que ens descartin la presència de lesions a distància que contraindiquin realitzar un tractament local radical. Els pacients candidats a un tractament local quirúrgic també hauran de realitzar un estudi complet del funcionalisme pulmonar. En els últims anys, cada vegada és d'utilització més universal la tomografia per emissió de positrons (PET) en el diagnòstic inicial del càncer de pulmó. Aquesta tècnica ens permet la identificació de lesions metastàtiques a distància, però també és molt útil per a l'estadiatge del mediastí, ja que ens pot detectar els pacients que són tributaris d'una exploració del mediastí, ja sigui per mediastinoscòpia o per ecoendoscòpia respiratòria o digestiva i punció aspiració amb agulla fina, previ a la realització d'un tractament quirúrgic o de quimio-radioteràpia.

En pacients en que existeixen varies lesions a l'estudi d'imatge, és recomanable biopsiar la lesió que ens permeti estadificar la malaltia en el seu grau més alt. D'aquesta manera, hi ha pacients que seran diagnosticats per la punció guiada d'una lesió metastàtica com per exemple una metàstasi hepàtica. En altres pacients

el diagnòstic pot realitzar-se també a partir de la resecció d'un nòdul pulmonar solitari o d'una lesió metastàtica única.

Tots aquests procediments diagnòstics ens permeten arribar finalment a un diagnòstic definitiu anatomopatològic i a una estadificació clínica de la malaltia. Aquesta estadificació es basa en el sistema TNM (de l'anglès, *Tumor, Node, Metastasis*), on la "T" descriu les característiques del tumor primari, la "N" descriu l'absència o presència i localització d'adenopaties regionals i la "M" indica la presència o absència de metàstasis a distància. La combinació de la T, la N i la M ens donarà l'estadi de la malaltia. Actualment el sistema TNM vigent és la 7a edició de la *International Association for the Study of Lung Cancer* (56), no obstant, el present treball recull l'estadiatge dels pacients segons la 6a edició del sistema TNM, ja que els pacients inclosos en els estudis van ser estadificats amb anterioritat a l'ús del sistema TNM més recent.

En els pacients afectes de CPCNP podem realitzar dos tipus d'estadiatge basats en el sistema TNM. El primer és l'estadiatge clínic, que està basat en la història clínica, l'examen físic, les troballes de laboratori, radiològiques i qualsevol altra prova realitzada amb anterioritat a un tractament primari. En aquest cas s'assigna el prefix "c" davant l'estadi, per exemple cT3N2M0. El segon és l'estadi patològic, basat en l'estadi clínic més les dades histopatològiques del tumor ressecat. L'estadi patològic proporciona la confirmació de la T, de la N i del subtipus histològic. A més, té en compte el grau histològic, l'estat dels marges de resecció i la presència o absència d'invasió limfovascular. En aquest cas assignem el prefix "p" davant l'estadi (57).

Els canvis més importants de la 7a edició del TNM son la reclassificació dels embassaments pleurals malignes i dels nòduls pulmonars separats. S'ha canviat algun punt de tall de mida i s'han subdividit els descriptors T1, T2 i M1 en dues categories (a i b) cadascun (58).

| TUMOR (T) | |
|-----------------------------------|--|
| T0 | No evidència de tumor primari. |
| TX | Tumor primari que no pot ser avaluat o presència de cèl·lules malignes a l'esput o rentat bronquial. |
| Tis | Carcinoma in situ. |
| T1 | Tumor <3 cm sense evidència d'invasió més proximal del bronqui lobar. |
| T2 | Tumor >3 cm o tumor de qualsevol mida amb qualsevol del següent: extensió proximal ≥ 2 cm distal de la carina; invasió de pleura visceral; associat a atelèctasi o pneumonitis obstructiva que no compromet el pulmó sencer. |
| T3 | Tumor de qualsevol mida amb qualsevol del següent: invasió de paret toràcica (incloent tumors del sulcus superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardi parietal; tumor amb extensió proximal <2 cm de la carina; atelèctasi associada o pneumonitis obstructiva del pulmó sencer. |
| T4 | Tumor de qualsevol mida que envaeix qualsevol de les següents estructures: mediastí, cor, grans vasos, tràquea, esòfag, cossos vertebrals, carina; tumor amb embassament pleural o pericàrdic maligne; nòdul o nòduls satèl·lits en el mateix lòbul que el tumor primari. |
| GANGLIS LIMFÀTICS (N) | |
| Nx | Ganglis regionals que no poden ser avaluats. |
| N0 | No metàstasis en ganglis limfàtics regionals. |
| N1 | Metàstasis a ganglis limfàtics ipsilaterals hiliars i/o peribronquials. |
| N2 | Metàstasis a ganglis limfàtics ipsilaterals mediastínic i/o subcarinals. |
| N3 | Metàstasis a ganglis limfàtics mediastínic contralaterals, hiliars contralaterals, escalens ipsilaterals o contralaterals, o supraclaviculars. |
| METÀSTASIS A DISTÀNCIA (M) | |
| Mx | No es pot avaluar la presència de metàstasis a distància. |
| M0 | No metàstasis a distància. |
| M1 | Metàstasis a distància. |

Taula 2. Sistema internacional d'estadificació TNM pel CPCNP (6a edició).

| Estadi | TNM |
|--------|--|
| I A | T1N0M0 |
| I B | T2N0M0 |
| II A | T1N1M0 |
| II B | T2N1M0 T3N0M0 |
| III A | T3N1M0 T1-3N2M0 |
| III B | Qualsevol T N3 M0 T4 Qualsevol N M0 |
| IV | Qualsevol T Qualsevol N M1 |

Taula 3. Agrupació per estadis.

1.6. Tractament dels estadis localitzats

Els tractaments per el CPCNP inclouen la cirurgia, la quimioteràpia, la radioteràpia o una combinació d'aquests. Com s'ha comentat, el sistema d'estadificació TNM s'utilitza per a planificar el tractament en cada cas.

Els pacients que tenen la malaltia localitzada a un pulmó i no tenen afectació de ganglis mediastínic són estadificats com estadis I o II i són candidats a un tractament quirúrgic d'entrada, sempre que la funció pulmonar o les patologies coexistents no ho contraindiquin. Posteriorment a la cirurgia, els pacients són re-estadificats segons el pTNM. Quan es detecta afectació ganglionar mediastínica, els pacients seran re-classificats a un estadi III. El procediment quirúrgic òptim és la lobectomia (59) tot i que els tumors proximals no sempre son resecables mitjançant aquesta tècnica i poden requerir altres reseccions més extenses o pneumonectomia. La lobectomia es pot realitzar per toracotomia oberta o per toracoscòpia videoassistida (60). Pel que fa a la resecció de ganglis limfàtics mediastínic, la seva extensió òptima no està definida, però es recomana la dissecció ganglionar mediastínica sistemàtica més que el mostreig sol (61, 62).

Altres tractaments locals a part de la cirurgia, i que es poden contemplar en cas que el pacient no sigui tributari a aquesta per comorbiditats, son la radioteràpia definitiva o l'ablació per radiofreqüència (63, 64).

En l'actualitat és estàndard la utilització de quimioteràpia adjuvant basada en cisplatí en els pacients en estadis II o III patològics. Aquesta indicació està recolzada per múltiples assaigs clínics i metaanàlisis que han demostrat un impacte

positiu del tractament en la supervivència dels pacients (65-68). Pel que fa als pacients en estadi I no s'ha demostrat un benefici del tractament, pel que aquests pacients no reben cap tractament complementari a la cirurgia. Únicament el subgrup de pacients en estadi Ib i amb una mida del tumor superior a 4 cm podrien beneficiar-se'n (69), pel que ens podem plantejar la seva indicació en aquest cas.

Pel què fa al tractament amb radioteràpia mediastínica complementària, existeix evidència que aquest pot reduir la freqüència de recaigudes locals en els casos d'afectació ganglionar N2, tot i que el seu impacte en la supervivència no està ben definit (70).

2. Factors pronòstics en malaltia precoç

2.1. Estadi

Un correcte estadiatge del CPCNP és crític per a determinar el tractament necessari per a cada cas i també per a poder predir el pronòstic. L'estadi TNM al diagnòstic és el marcador més important del pronòstic. La supervivència global del càncer de pulmó als 5 anys està al voltant del 15%, i això és degut primàriament a que només una tercera part dels pacients es diagnostiquen en estadis precoços i per tant, tributaris a un tractament quirúrgic.

| | cTNM | pTNM |
|-------------|------|------|
| IA | 50% | 73% |
| IB | 43% | 58% |
| IIA | 36% | 46% |
| IIB | 25% | 36% |
| IIIA | 19% | 24% |

Taula 4. Supervivència als 5 anys segons l'estadi clínic i patològic del CPCNP localitzat. Adaptat de (56).

2.2. Histologia

Varis estudis han mostrat resultats conflictius pel que fa a la influència de la histologia en el pronòstic (71-74). No hi ha tants dubtes pel que fa al grau histològic de tumor, ja que la supervivència disminueix des dels tumors ben diferenciats, als moderadament diferenciats i finalment, als pobrament diferenciats o indiferenciats (75).

2.3. Cirurgia

Els hospitals que realitzen un gran nombre de cirurgies pel CPCNP tenen una mortalitat perioperatòria significativament inferior. A més, la supervivència a 5 anys és superior en individus que han realitzat la resecció en centres d'alt volum de casos (76, 77). En referència a la cirurgia, també cal dir que les reseccions inferiors a la lobectomia s'associen a una pitjor supervivència.

2.4. Paràmetres dependents del pacient

Existeixen una sèrie de paràmetres que depenen de cada pacient i que hem de tenir en compte quan parlem de pronòstic. Aquests són l'edat, el sexe, la presència d'altres patologies i l'estat general.

Els pacients d'edat avançada tindran amb més freqüència comorbiditats que conferiran un pitjor pronòstic, o que contraindicaran la cirurgia. No obstant, l'edat no sembla tenir influència com a marcador pronòstic independent en els estadis avançats (78).

Pel que fa al sexe, el sexe masculí representa un factor de mal pronòstic independent i la supervivència als 5 anys és inferior en homes que en dones (79, 80).

Les comorbiditats del pacient, com per exemple el tabaquisme, la malaltia pulmonar obstructiva crònica, la fibrosi pulmonar, la demència i moltes altres patologies, clarament poden afectar al pronòstic i a la supervivència dels pacients amb CPCNP (81, 82).

Finalment, una eina clínica que ens permetrà predir el pronòstic i també seleccionar el millor tractament en cada cas és l'escala d'estat general *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status* (ECOG PS). Aquest paràmetre té un valor pronòstic independent per a la supervivència (73, 74).

| Puntuació | ECOG PS |
|-----------|--|
| 0 | Assintomàtic. Activitat normal de la vida diària. |
| 1 | Pacient ambulatori amb limitació de les activitats que requereixen esforços. Pot realitzar treballs lleugers o sedentaris. |
| 2 | Pacient capaç de cuidar-se, però no pot realitzar qualsevol treball. Enllitat < 50% de les hores del dia. |
| 3 | Parcialment dependent per cuidar-se. Enllitat > 50% del temps diürn. |
| 4 | Enllitat tot el dia, totalment dependent per activitats bàsiques de la vida diària. |
| 5 | Mort |

Taula 5. Escala de mesura de l'estat funcional ECOG PS.

2.5. Marcadors moleculars

Malgrat els anteriors factors pronòstics, a la pràctica clínica ens trobem que hi ha pacients amb idèntiques condicions clíniques i estadi que recauen i moren de la malaltia, i en canvi, altres pacients que no recidiven mai. Aquest fet fa que sigui important buscar biomarcadors que ens ajudin a predir quin pacient té pitjor pronòstic i més risc de recidiva després del tractament quirúrgic. Això és de vital importància en el cas de l'estadi I, en el que no s'utilitza la quimioteràpia adjuvant de forma rutinària, però que podria ser útil en alguns pacients seleccionats.

S'han desenvolupat perfils d'expressió gènica que poden predir el pronòstic de pacients amb CPCNP (83-85), però aquests resultats s'han de validar en estudis prospectius.

L'expressió de la proteïna de reparació del DNA ERCC1, a part de ser un marcador de resistència al tractament amb cisplatí, és un marcador de bon pronòstic en CPCNP precoç (86, 87). L'expressió de ERCC1 i RRM1 (una proteïna relacionada amb la síntesi de DNA) s'associen a un millor pronòstic en pacients amb CPCNP tractats únicament amb cirurgia (88). En un altre estudi, nivells alts de RRM1 i PTEN també s'han descrit com a factors de millor supervivència i millor supervivència lliure de malaltia (89).

La sobre-expressió de TP53 en el tumor s'ha associat a un pitjor pronòstic, així com la presència de mutacions a *KRAS* (90-92). La metilació de la regió promotora de 4 gens amb una potencial importància en la patogènia del CPCNP (*CDKN2A*, *CDH13*, *APC* i *RASSF1A*) s'ha associat amb un risc significatiu superior de recaiguda (93). Mutacions activadores en el domini tirosina quinasa de *EGFR* poden desregular la via i promoure la neoplàsia i tot i que el paper pronòstic en malaltia localitzada no ha estat establert, la presència d'aquestes mutacions confereix un millor pronòstic i una millor resposta a fàrmacs inhibidors del domini tirosina quinasa en malaltia avançada (94). La sobre-expressió de Her-2 també ha estat descrita com un factor de pitjor pronòstic, tant pel que fa a supervivència com a recurrència post-quirúrgica (95, 96). L'expressió del receptor tirosina quinasa Met i del seu lligand, el factor de creixement hepatocitari (HGF, de l'anglès, *hepatocyte growth factor*) han estat involucrats amb un comportament biològic més agressiu del CPCNP i un pitjor pronòstic (97, 98). La pèrdua de la proteïna Rb s'ha associat a una supervivència més curta després de la cirurgia (99). El paper pronòstic de la pèrdua de p16, que és un event comú en CPCNP, no està del tot definit, ja que els resultats no són del tot consistents (100, 101). Vàries metal·loproteases, com MMP2, MMP9 i l'inhibidor

tissular de les metal·loproteases TIMP-1 s'han associat a un pitjor pronòstic en CPCNP precoç (102-105). Finalment, la sobre-expressió de Cox-2 també s'ha associat a un pitjor pronòstic després de la cirurgia de CPCNP en estadi precoç (106).

3. Polimorfismes genètics

Els polimorfismes representen canvis de nucleòtids en la seqüència del DNA d'un individu. Hi ha varis tipus de polimorfismes: repeticions en tàndem de nucleòtids (microsatèl·lits i minisatèl·lits), duplicacions, insercions, delecions i canvis d'un únic nucleòtid o SNPs (de l'anglès, *single nucleotide polymorphisms*). Els SNPs són la forma més freqüent de variació genètica del genoma humà, ja que representen fins el 90% d'elles (107). Es calcula que es troba un SNP cada 100-300 parells de bases. Van ser descrits inicialment el 1978 en el *cluster* del gen de la β -globina (108). Una variació es considera polimorfisme si afecta almenys a l'1% de la població, sinó es consideraria una mutació puntual. Un SNP no necessàriament ha de conduir a una situació patològica sinó que pot representar una avantatge genètica en determinades situacions, per exemple, pot estar associat amb una disminució del risc de desenvolupar càncer (109). Els SNPs són responsables de diferències genètiques hereditàries entre individus, que no es modifiquen durant la vida d'aquests.

Els SNPs poden trobar-se tant en regions exòniques, com en introns o en regions reguladores del gen. Un SNP en un exó pot donar lloc a un canvi d'aminoàcid en la proteïna i per tant, afectar la funció d'aquesta. També podem trobar SNPs en exons que, donada la redundància del codi genètic, no tenen com a conseqüència un canvi en la seqüència de la proteïna, i llavors parlem de SNPs silencis o sinònims. Els SNPs en regions intròniques també poden arribar a produir canvis en la proteïna si estan en una regió afectada pel fenomen de *splicing* alternatiu o inclús poden afectar l'expressió de proteïnes si estan localitzats en regions codificants per miRNAs (110, 111). SNPs en regions reguladores, com en el promotor del gen, poden afectar també a l'expressió gènica. Un SNP en el lloc d'unió d'un factor de transcripció pot tenir vàries conseqüències: en molts casos, la interacció entre el lloc d'unió i el factor de transcripció no es veurà afectada, però també pot passar que la unió estigui augmentada o disminuïda, trobant així diferències en l'expressió gènica segons l'al·lel (112).

Existeixen bases de dades públiques, com la del *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) o la *SNP 500 Cancer database* (<http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/home.do>), amb milions de polimorfismes descrits.

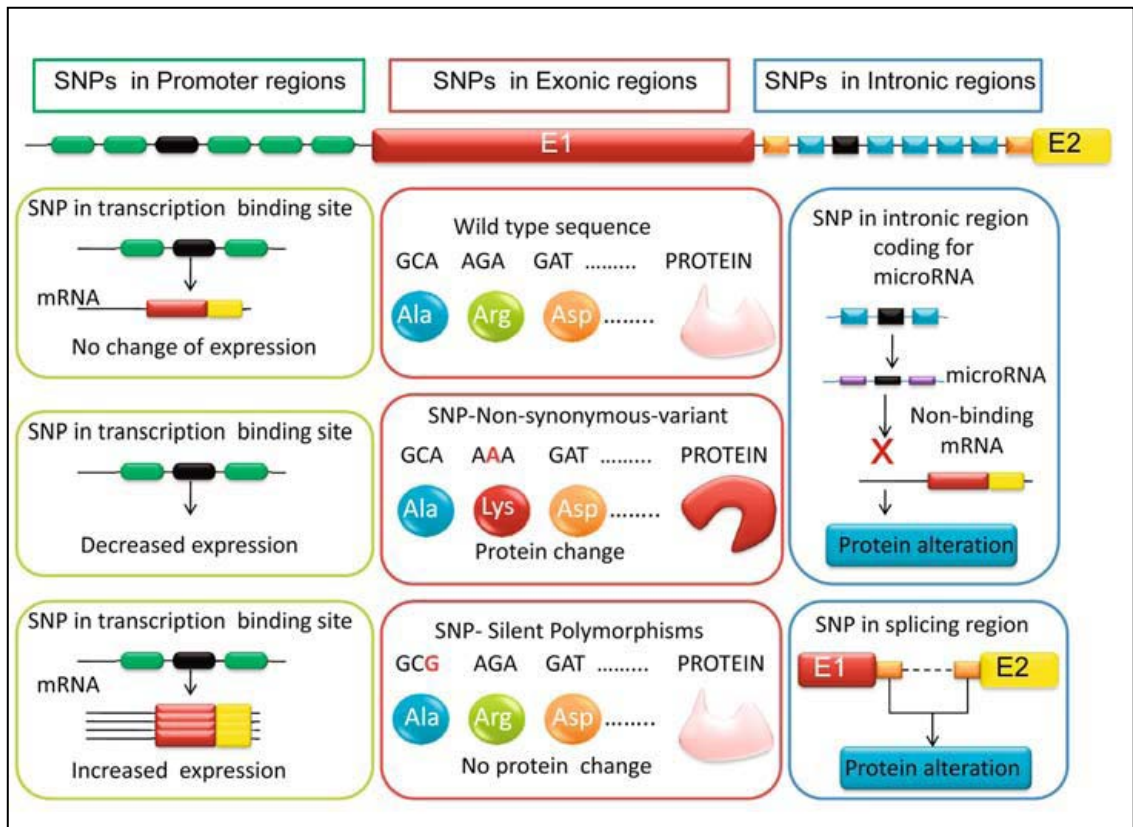


Figura 1. La localització dels SNPs i els seus efectes biològics (110).

Amb el descobriment dels SNPs, es va obrir un camp de recerca important en farmacogenòmica per a l'estudi de la variabilitat interindividual en la resposta o toxicitat a fàrmacs (113). En la figura 2 es mostren algunes proteïnes que es poden veure afectades per SNPs que poden influenciar en la toxicitat dels fàrmacs o en la quimioresistència. També ha tingut repercussió en epidemiologia, ja que s'ha estudiat la influència de SNPs en la susceptibilitat a desenvolupar malalties, com el càncer.

En oncologia, l'anàlisi de SNPs en gens candidats, a més de l'interès en la predicció de l'eficàcia o la toxicitat dels fàrmacs antitumorals segons els genotips (110, 114, 115), pot tenir interès també en l'estudi de la diferent evolució clínica de la malaltia una vegada diagnosticada. Així, els SNP poden representar marcadors pronòstics (116, 117). D'aquesta manera, l'anàlisi dels SNPs podria ser fet en el moment del diagnòstic, de tal manera que ens permetés predir quin seria el millor fàrmac per un determinat pacient o bé ens donés informació pronòstica que ens guiés en el seguiment.

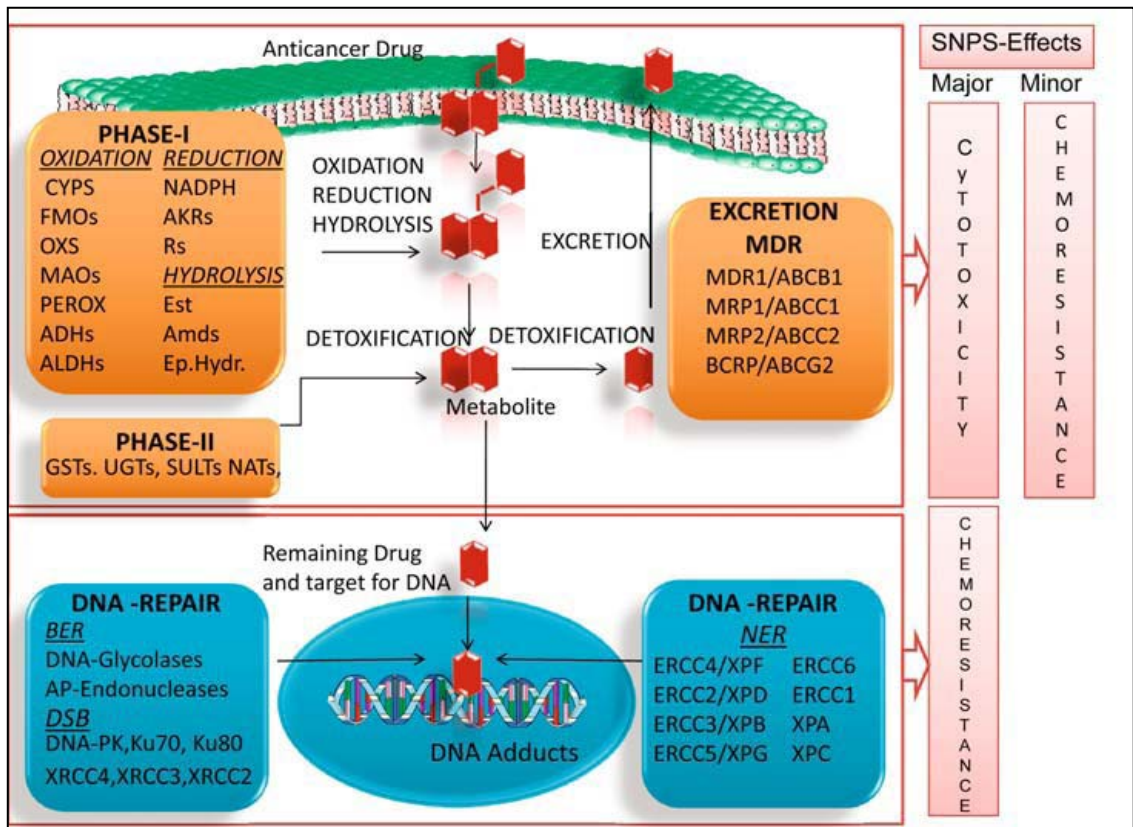


Figura 2. Proteïnes relacionades amb el metabolisme i quimioresistència (110).

4. Metabolisme dels carcinògens del tabac, reparació del DNA i

MDR1

4.1. Carcinògens del tabac

Un carcinogen és un agent, químic, físic o viral, que causa càncer o incrementa el seu risc. Hi ha uns 4000 agents químics identificats en el fum del tabac i d'aquests, més de 60 han estat reconeguts com a carcinògens (118). Aquests carcinògens pertanyen a diverses classes d'agents químics com els PAHs, aza-arens, *N*-nitrosamines, amines aromàtiques, amines heterocícliques, aldehids, hidrocarburs volàtils, metalls i altres components orgànics i inorgànics (19).

Han estat establerts com a carcinògens pulmonars del fum del tabac els PAHs, aza-arens, les nitrosamines específiques del tabac, com la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (també coneguda per l'acrònim NNK, de l'anglès, *nicotine-derived nitrosamino ketone*), 1,3-butadiè, carbamat d'etil, òxid d'etilè, níquel, crom, cadmi, poloni-210, arsènic i hidracina (19).

Els carcinògens més potents són els PAHs, les *N*-nitrosamines i les amines aromàtiques. Aquest component estan presents en petites quantitats, de 5 a 200 ng per cigarreta. En canvi, els carcinògens més prevalents són els aldehids i altres components orgànics volàtils com el benzè i el butadiè, trobats en quantitats de 10 a 1000 µg per cigarreta. La quantitat total de carcinògens en el fum del tabac va de 1 a 3 mg per cigarreta (similar a la quantitat de nicotina, que és 0,5 a 1,5 mg per cigarreta) (119). En relació al càncer de pulmó, els carcinògens més importants són els PAHs, com el BaP i la nitrosamina específica del tabac NNK (18). Encara que la dosi de cada carcinogen per cigarreta és molt petita, la dosi acumulativa durant la vida d'un fumador pot ser considerable. La nicotina no es considera un carcinogen, no obstant, sembla que pot induir tumors en algunes condicions especials com la hiperòxia (120). A més, la nicotina pot ser convertida en l'organisme cap alguns carcinògens com la NNK (121). També cal tenir en compte que el tabac no cremat conté menors quantitats de carcinògens que el seu fum, ja que la gran majoria d'aquests es formen durant la seva combustió.

4.2. Activació metabòlica i destoxicació dels carcinògens

De manera general, l'activació metabòlica porta a la formació d'adductes en el DNA. Aquests representen unions covalents entre els carcinògens i el DNA, generalment a una guanina o a una adenina. Si aquest adductes no són reparats i persisteixen, llavors poden donar lloc a un error en la replicació, resultant en una mutació

permanent. No obstant, les cèl·lules amb danys en el DNA encara poden ser eliminades per apoptosi. Si una mutació esdevé en una regió crítica com un oncogen o un gen supressor tumoral, llavors pot ocórrer la seva activació o desactivació, respectivament, i la cèl·lula pot perdre els mecanismes de control del creixement cel·lular (122).

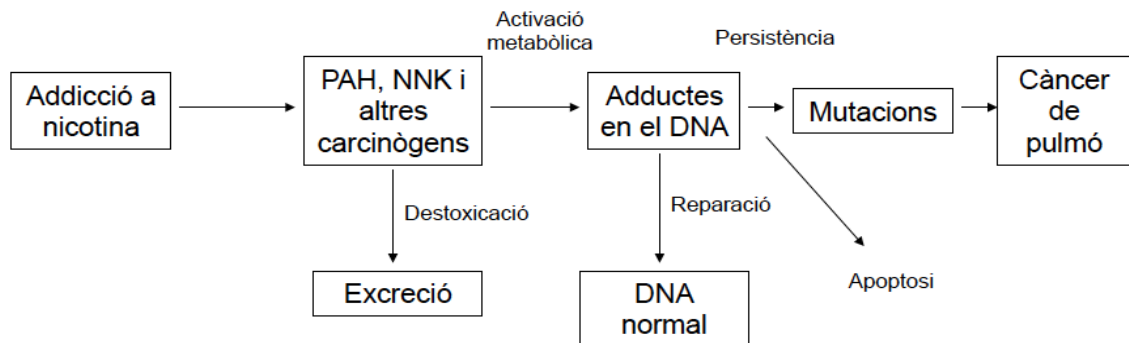


Figura 3. Visió general del metabolisme i efecte dels carcinògens del tabac.

El procés general de metabolització dels carcinògens consta de diferents sistemes pels quals aquests carcinògens són transformats enzimàticament en una sèrie de metabòlits més fàcilment excretables per l'organisme. Podem dividir aquests sistemes en dos fases (fase I i fase II).

Els enzims de fase I metabolitzen els xenobiòtics cap a altres components, catalitzant l'addició d'un àtom d'oxigen al carcinogen, i fent així la molècula més fàcilment eliminable (123). Els enzims del citocrom P450 són una classe important d'enzims de fase I. Aquests estan codificats per aproximadament 60 gens que formen diverses famílies, i la majoria són polimòrfics. Els gens CYP s'anomenen per un número de família aràbic, una lletra que indica la subfamília (A, B, C, etc.) i un altre número aràbic que indica el membre individual de la subfamília. El gen que codifica pel citocrom P4501A1 (CYP1A1) és un dels més activament implicats en el metabolisme del BaP i és un dels més estudiats. CYP2C8 i altres també s'han relacionat amb el metabolisme del BaP (124).

El procés de metabolització pels enzims de fase I ve continuat pels enzims de fase II, que converteixen el carcinogen oxigenat cap a una molècula altament hidrosoluble i més fàcilment excretable per l'organisme. Alguns d'aquests són les *glutatió-S-transferases* (GSTs), les *uridina-5'-difosfo-glucuronosiltransferases*

(UGTs), sulfatases, *N*-acetiltransferases (NATs) i les hidrolases d'epòxid microsòmiques. Aquest últim, a part d'actuar com un enzim de fase II, també pot activar els PAHs cap a molècules més reactives (125, 126). Altres enzims involucrats en el metabolisme de carcinògens són la mieloperoxidasa (MPO), que oxida els procarcinògens i la NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1 (NQO1), que pot actuar tant en l'activació com en la inactivació de carcinògens.

Si aquest procés de metabolització dels carcinògens és totalment eficient l'organisme està protegit. No obstant, a vegades, per un fenomen d'activació metabòlica, poden generar-se metabòlits intermediaris reactius en les reaccions de fase I. D'aquesta manera, alguns dels metabòlits intermediaris produïts per la interacció dels carcinògens amb el citocrom P450 són electrofílics i poden reaccionar amb el DNA i altres molècules per a formar adductes. Aquest procés, mitjançant el qual un carcinogen no reactiu és convertit a una forma que interacciona amb el DNA, és el que es coneix com a fenomen d'activació metabòlica. Les altres reaccions es consideren vies de destoxicació (18).

El balanç entre l'activació metabòlica i la destoxicació varia entre els diferents individus i pot afectar el risc de desenvolupar càncer, ja que els adductes en el DNA són importants en el procés de la carcinogènesi (127). Cal considerar que la majoria dels carcinògens del tabac requereixen de l'activació metabòlica per poder reaccionar amb el DNA. No obstant, alguns d'ells, com l'acetaldehid, l'òxid d'etilè i el formaldehid, poden reaccionar directament.

En la figura 4 podem veure esquematitzades les vies d'activació metabòlica de 6 carcinògens del tabac:

a- La via d'activació metabòlica més important per el BaP és la conversió a 7,8-diol-9,10-epòxids. En detall, el BaP és metabolitzat a epòxids pel citocrom P450, que són convertits cap a diol epòxids per les epòxid hidrolases (EHs) i el citocrom P450. Els diol epòxids reaccionen amb el DNA. Els epòxids formats inicialment poden també transformar-se cap a fenols, la majoria dels quals son productes de destoxicació. No obstant, alguns fenols poden ser oxidats cap a epòxids, que reaccionen amb el DNA. Les altres vies mostrades representen vies de destoxicació i d'excreció de metabòlits. Els enzims involucrats són les GSTs i les UGTs.

b- La NNK es metabolitza cap a α -hidroxiNNKs pel citocrom P450. Aquests es descomponen espontàniament cap a ions diazoni i aldehids. Els ions diazoni reaccionen amb el DNA per a formar adductes. La NNK també pot patir una

reducció cap a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), que es converteix a NNAL-glucurònids (NNAL-glucs). La α -hidroxilació de NNAL pel citocrom P450 resulta en ions diazoni.

c- La N-nitrosodimetilamina (NDMA) és convertida pel citocrom P450 a α -hidroxiNDMA, que espontàniament es descompon a metildiazoni i formaldehid. El primer reacciona amb el DNA. Les vies de detoxicació de NDMA inclouen la producció de nitrit i metilamina.

d- La N'-nitrosonorcicotina (NNN) és metabolitzada pel citocrom P450 per donar α -hidroxiNNN, que és inestable i acaba donant ions diazoni, que reaccionen amb el DNA. Les vies de detoxicació inclouen la producció de norcotinina i altres metabòlits.

e- L'òxid d'etilè pot reaccionar directament amb el DNA. En la seva detoxicació també juguen un paper les GSTs.

f- Una amina aromàtica, el 4-Aminobifenil (4-ABP) pot ser metabolitzat per les NATs i produir molècules que reaccionen amb el DNA.

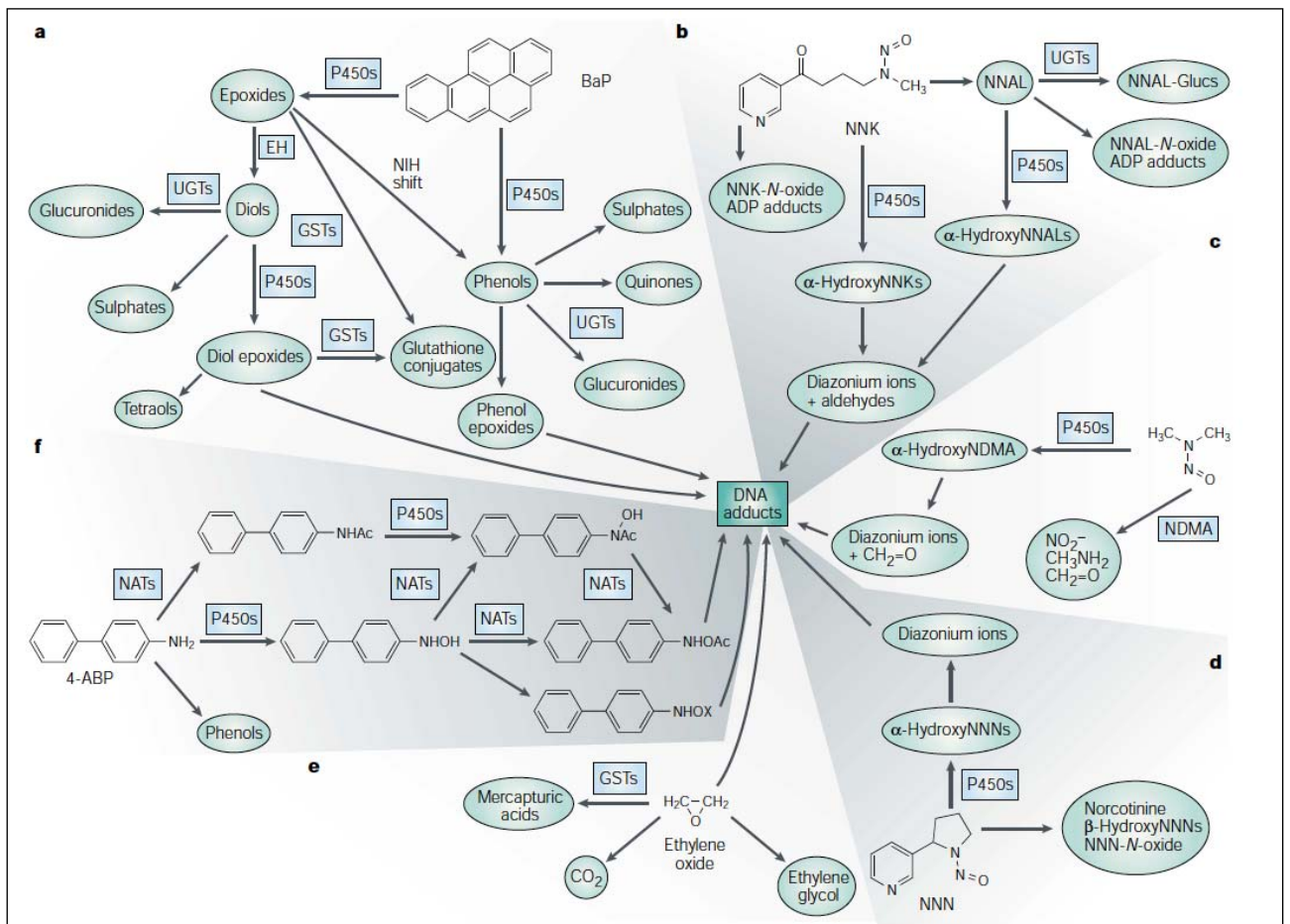


Figura 4. Vies d'activació metabòlica de 6 carcinògens principals del tabac.

4.3. MDR1/ABCB1

El gen *MDR1* (de l'anglès, multidrug resistance gene 1) codifica per la p-glicoproteïna, una proteïna transmembrana de la superfamília *ATP-binding cassette* (ABC), que transporta varies molècules des del citosol cap a l'espai extracel·lular, amb la finalitat de reduir l'acumulació de substàncies tòxiques en la cèl·lula (128). Actualment aquest gen es coneix com *ABCB1* (ATP-binding cassette, sub-family B, member 1). Va ser la primera proteïna dels transportadors ABC descrita i és la més ben coneguda (129).

Podem trobar la p-glicoproteïna expressada en varis teixits humans com l'intestí, el fetge, el ronyó i a l'endoteli dels capil·lars. La seva funció és excretar diferents substàncies citotòxiques cap al tracte gastrointestinal, via biliar, orina i també participa en la funció de la barrera hemato-encefàlica (130). La seva expressió en el teixit pulmonar també ha estat descrita, suggerint un paper defensiu contra diferents substàncies tòxiques, com el BaP i altres carcinògens del tabac (131, 132).

Una característica interessant de la p-glicoproteïna és que els seus substrats varien considerablement en la seva estructura i funcionalitat, anant des de molècules molt petites com cations orgànics, hidrats de carboni, aminoàcids i alguns antibiòtics, fins a macromolècules com polisacàrids i proteïnes (133). La p-glicoproteïna consisteix en 1276-1280 aminoàcids i té una estructura duplicada en tàndem, amb cada part de la molècula contenint un domini d'unió a nucleòtids i sis dominis transmembrana. Es creu que els dominis transmembrana formen el camí per on les diferents molècules travessen la membrana. Els extrems NH₂- i COOH- terminals, així com els dominis d'unió a nucleòtids, estan localitzats a l'espai intracel·lular.

4.4. Reparació del DNA

La reparació del DNA consta d'unes vies bioquímiques complexes mitjançant les quals es procedeix a restaurar el correcte estat del DNA una vegada hi ha hagut una alteració en la seva estructura. D'aquesta manera, s'han desenvolupat mecanismes complexos de reparació genètica que estan involucrats en l'eliminació dels adductes de DNA i el restabliment de la seva estructura normal. Tot i això, aquests mecanismes no són totalment eficaços i alguns adductes en el DNA no són reparats i poden acabar produint mutacions que poden activar alguns oncogens o inactivar un gen supressor tumoral.

Existeixen varis mecanismes de reparació del DNA: reparació directa, reparació per excisió de bases (BER, de l'anglès *base excision repair*), reparació per excisió de

nucleòtids (NER, de l'anglès *nucleotide excision repair*), *double-strand break repair* i reparació de *interstrand cross-links*.

El sistema NER és el més important per eliminar les grans lesions en el DNA, com les formades per l'exposició a radiacions i a substàncies químiques. Els adductes produïts pels PAHs són reparats per aquest mecanisme i és el que tractarem a continuació. Per aquest sistema, les bases danyades són eliminades per una nucleasa d'excisió, un enzim format per varies subunitats. Aquest és un sistema amb substrats amplis, que no és capaç d'identificar els grups químics específics que formen la lesió. El procés de NER consta de varis passos i requereix de la participació de varies proteïnes:

- a- Reconeixement de la lesió.
- b- Incisió dual per a separar un oligòmer d'uns 24-32 nucleòtids que conté la lesió.
- c- Alliberació de l'oligonucleòtid.
- d- Reparació del forat causat.
- e- Lligació.

| Factor | Proteïnes | Activitat | Funció |
|-----------|--|---|---|
| XPA | XPA/p31 | Unió al DNA | Reconeixement del dany |
| RPA | p70 p32 p11 | Unió al DNA Factor de replicació | Reconeixement del dany |
| XPC | XPC/p106 HR23B/p58 | Unió al DNA | Reconeixement del dany <i>Molecular matchmaker</i> |
| TFIIH | XPB/ERCC3/p89 XPD/ERCC2/p80 p62 p52 p44 p34 | ATPasa dependent de DNA Helicasa Factor de transcripció | Desenrotllament del dúplex de DNA Dissociació del complex (correcció cinètica) |
| XPG | XPG/ERCC5/p135 | Endonucleasa | Incisió 3' |
| XPF-ERCC1 | XPF/ERCC4/p112 ERCC1/p33 | Endonucleasa | Incisió 5' |

Taula 6. Factors implicats en el procés de NER.

En humans el procés de reparació per NER és portat a terme per 6 factors: RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG i XPF-ERCC1.

En la figura 5 es mostra esquematitzat el procés de NER. El dany en el DNA és reconegut cooperativament per RPA, XPA i XPC-TFIIH. Els 4 factors de reparació formen un complex en el lloc d'unió. Si el lloc està lliure de dany, una hidròlisi d'ATP per les helicases XPB i XPD dissocia el complex (correcció cinètica). Si el lloc conté una lesió, una hidròlisi d'ATP desenrotlla el dúplex en aproximadament 25 parells de bases del lloc danyat, formant un complex de preincisió (PIC) estable anomenat PIC1. Llavors, XPG substitueix a XPC en el complex per formar el complex de preincisió 2 (PIC2). Finalment, es recluta XPF-ERCC1 en el lloc per formar el complex de preincisió 3 (PIC3). La cadena danyada és tallada en el 6è \pm 3 enllaç fosfodièster en sentit 3' a la lesió, per XPG, i en el 20è \pm 5 enllaç fosfodièster en sentit 5' al dany per XPF-ERCC1. La base danyada normalment se situa més a prop de l'extrem 3' que del 5'. El resultat és l'alliberació d'un oligonucleòtid de 24 a 32 nucleòtids de llargada. El forat causat en el dúplex de DNA serà omplert per síntesi de DNA per una polimerasa (Pol δ/ϵ) amb l'ajuda de proteïnes de replicació accessòries (PCNA i RFC) i l'últim nucleòtid serà unit covalentment a la cadena per una DNA lligasa . Malgrat tot, la discriminació del sistema entre DNA danyat i DNA no danyat no és absoluta i l'enzim pot escindir oligòmers també de regions no danyades amb un potencial efecte mutagènic (134, 135).

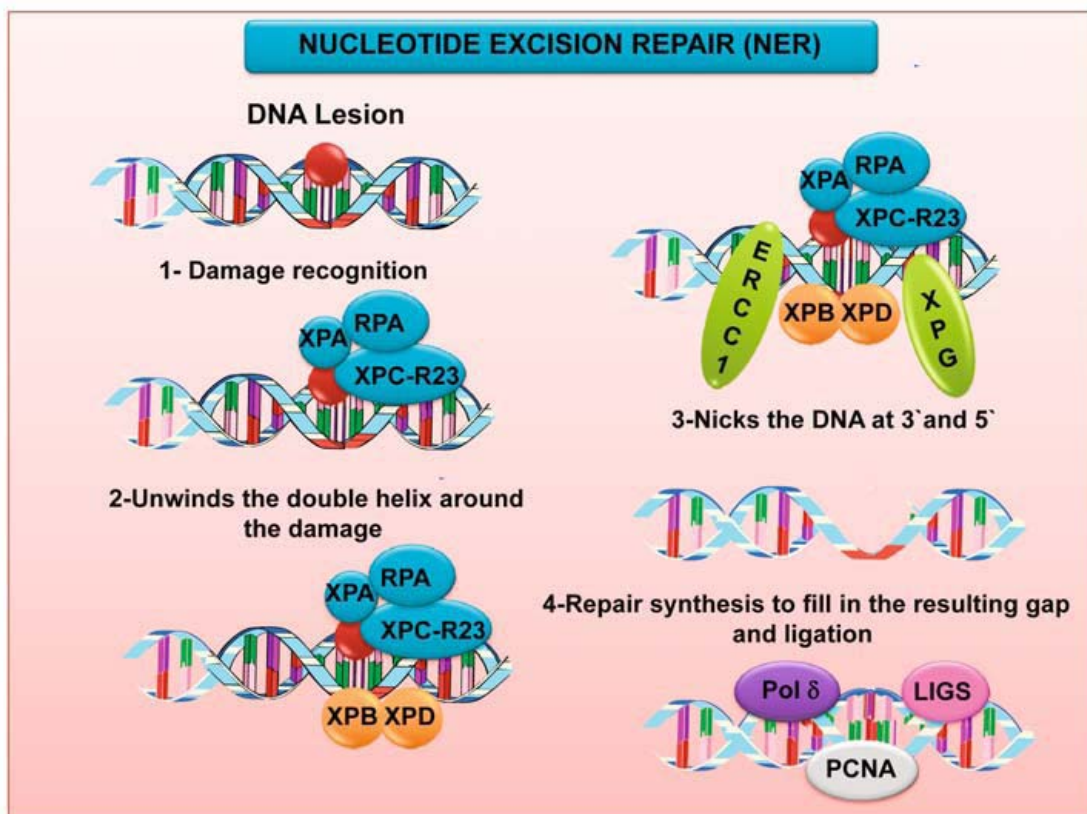


Figura 5. Esquema del procés de NER (110).

4.5. Polimorfismes en gens de metabolització del tabac, reparació del DNA i MDR1 i risc de càncer de pulmó. Paper pronòstic en malaltia localitzada.

És ben conegut que encara que el tabac és la principal causa del càncer de pulmó, menys del 20% dels fumadors desenvolupen la malaltia. Existeix una diferent susceptibilitat genètica a desenvolupar càncer de pulmó, i aquest fet podria explicar perquè individus amb exposició a un factor de risc desenvolupen la malaltia i perquè altres individus amb una exposició equivalent al mateix factor de risc no la desenvolupen.

Si ens fixem en el factor de risc que representa l'exposició als carcinògens del tabac, la susceptibilitat genètica a desenvolupar càncer de pulmó podria explicar-se per diferents SNPs en gens de metabolització dels carcinògens del tabac, en gens implicats en la reparació del DNA o en gens implicats en l'expulsió de carcinògens de les cèl·lules.

Primerament, diferències en els nivells d'adductes en el DNA no estan relacionats únicament als nivells d'exposició, sinó també a l'activitat dels enzims de

metabolització. Varis estudis han mostrat variacions interindividuais en el metabolisme del BaP i en la formació d'adductes per aquest carcinogen (136). Aquestes variacions poden ser degudes a diferents SNPs en els gens implicats en el metabolisme del BaP i altres carcinògens del tabac. Varis SNPs en gens codificants per aquests enzims de metabolització del tabac podrien canviar la seva activitat catalítica, canviant d'aquesta manera la proporció per la qual els carcinògens de tabac són activats o inactivats, i per tant, podrien modular el risc de desenvolupar càncers relacionats amb el tabac (137-139). En concret, una variant altament activa d'un enzim de fase I podria produir una quantitat més gran de metabòlits intermediaris reactius, i per tant, més adductes en el DNA que una variant menys activa del mateix enzim. D'altra banda, una variant menys activa d'un enzim de fase II podria destoxicar els metabòlits intermediaris a una velocitat inferior que una variant més activa, resultant en una acumulació major de reactius intermediaris i en una potencial creació més gran d'adductes. Per tant, SNPs en els gens codificants per aquests enzims poden contribuir a la varietat interindividual en els nivells d'adductes en el DNA, que pot causar una diferent susceptibilitat a desenvolupar càncer de pulmó.

Per un raonament similar a l'anterior, podem dir que una variant menys activa d'un enzim de reparació del DNA repararà els danys a una velocitat inferior. Existeixen diferències interindividuais en aquests mecanismes de reparació que poden modular la capacitat de reparació del DNA i afectar el risc de càncer (140-142). S'ha descrit també que els pacients amb càncer de pulmó tenen una capacitat de reparació del DNA menor que individus sans (143, 144). Pel què fa al gen *MDR1/ABCB1*, s'han descrit SNPs que poden canviar l'activitat de la p-glicoproteïna (130, 145).

Si ens centrem en estudis que descriguin l'associació entre variants polimòrfiques de gens codificants per enzims de metabolització de carcinògens o de gens de reparació del DNA, amb el risc de desenvolupar CPCNP, trobem a la literatura múltiples estudis, alguns d'ells amb resultats conflictius o contradictoris. Pel què fa a SNPs en gens de metabolització de carcinògens, vull destacar l'associació de variants a *CYP1A1*, *GSTM1*, *MPO*, *NQO1*, i *EPOXH1* amb un risc incrementat. A més, hi ha estudis que han mostrat risc de càncer de pulmó amb algunes combinacions de SNPs en varis enzims de metabolització de carcinògens, incloent gens com *GSTT1* i *NAT2* (146). Els estudis que troben associacions entre SNPs en gens de reparació del DNA i una diferent susceptibilitat al càncer de pulmó inclouen gens implicats en la reparació per BER (*XRCC1*, *OGG1*) (141) i en la via de NER

(*XPD*, *ERCC1*) (142, 146, 147). També existeix un SNP en la regió 3'-UTR de *MDR1* que s'ha associat a risc major de càncer de pulmó (148).

A part de la modificació del risc de desenvolupar CPCNP, existeix poca informació sobre el paper d'aquests SNPs en el pronòstic del CPCNP localitzat. S'ha descrit una associació entre un SNP a *XRCC1* i la supervivència lliure de progressió de pacients amb CPCNP en estadis I-III tractats amb radioteràpia definitiva o post-operatòria (149). Una variant polimòrfica a *ERCC1* (C8092A) podria influenciar també en la supervivència del CPCNP després de la resecció quirúrgica en pacients que no han rebut quimioteràpia complementària (150). Finalment, destacar un altre treball recent que analitza 48 SNPs en 27 gens de reparació del DNA i que identifica 6 variants que resulten pronòstiques per supervivència en CPCNP després de la resecció quirúrgica (151).

5. Generalitats sobre els miRNAs

5.1. Introducció

Els miRNAs madurs són petits RNAs formats per 22-24 nucleòtids que no codifiquen per a proteïnes. La seva funció principal és la d'inhibir de manera post-transcripcional la traducció d'un RNA missatger (mRNA) a proteïna, mitjançant la unió del miRNA a la zona 3'-UTR del mRNA. El primer miRNA va ser descrit l'any 1993 en el nematode *C. Elegans* (152) i en l'actualitat se'n coneixen més de mil.

Es pensa que els miRNAs regulen una tercera part del genoma humà. Estan codificats en tot el genoma, incloent regions exòniques, intròniques i també intergèniques. No obstant, el 90% d'ells estan codificats en regions intròniques (153), regions que en un passat recent s'havien considerat DNA "escombraries", ja que es pensava que no tenien cap funcionalitat.

La nomenclatura dels miRNAs ve definida per miR- seguit d'un número (per exemple, miR-125). MiRNAs de seqüència similars es poden distingir per una lletra darrera el número (per exemple, miR-125b). Un miRNA amb una seqüència madura idèntica pot estar codificat en diferents *loci* genòmics amb unes seqüències precursors diferents. En aquest darrer cas, els diferents gens es distingiran per un altre número addicional al final (per exemple, miR-125b-1). Aproximadament una tercera part dels miRNAs en humans estan organitzats en *clusters*. Varis d'aquests *clusters* contenen dos o més miRNAs de seqüència similar. No obstant, no tots els miRNAs d'un mateix *cluster* s'expressen al mateix nivell si analitzem el miRNA madur (154).

S'ha descrit a partir d'algoritmes de predicció *in silico* que els miRNAs regulen almenys el 30% dels gens codificants per a proteïnes (155). Estan altament conservats en diferents espècies, són específics per teixits i per estadi del desenvolupament i juguen un paper important en varis processos com el desenvolupament, la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi. Existeix evidència que els miRNAs poden actuar com a oncogens o gens supressors de tumors, depenent de les seves dianes, regulant així la funció de proteïnes clau per a la proliferació cel·lular, la supervivència, la reparació del DNA i la resposta immune (156). Varis estudis han demostrat que els miRNAs estan expressats de forma aberrant en diferents càncers (157). Alguns miRNAs s'han trobat sobre-expressats o infra-expressats en el teixit tumoral respecte el teixit normal. A més, l'expressió de miRNAs és característica per un tipus tumoral o estadi del tumor. El primer anàlisi

sistemàtic de centenars de mostres de tumors i teixits normals va permetre classificar varis càncers basant-se en el perfil d'expressió de miRNAs (158).

Per tot lo anterior s'ha proposat que l'estudi de miRNAs pot tenir utilitat en diferents aspectes del càncer com el seu desenvolupament, la progressió, el diagnòstic i el pronòstic. Una vessant més recent és el del potencial valor dels miRNAs com a eina terapèutica contra el càncer, ja sigui modulant la seva expressió, re-introduint miRNAs perduts en càncer o inhibint miRNAs oncogènics (157, 159).

5.2. Biogènesi

Els gens de miRNA són transcrits per la RNA polimerasa II per formar uns trànscrips primaris llargs anomenats miRNAs primaris (pri-miRNA), de mida variable. Aquests són reconeguts i tallats en el nucli per la RNasa III Drosha i el seu cofactor Pasha, per produir un miRNA precursor anomenat pre-miRNA, d'uns 70 nucleòtids de llargada. Llavors les proteïnes RAN-GTP i exportina-5 transporten el pre-miRNA cap al citoplasma. Un altre enzim RNasa III, Dicer, conjuntament amb TRBP, processa el pre-miRNA per generar un dúplex de miRNA de 19-24 nucleòtids. Amb l'ajuda del complex de proteïnes argonautes, només una cadena d'aquest dúplex de miRNA és incorporada a un gran complex proteic anomenat RISC (*RNA-induced silencing complex*). Aquest miRNA madur s'uneix al lloc complementari del seu mRNA diana, provocant la repressió de la traducció proteica en el cas de que la complementarietat no sigui perfecta o una degradació del mRNA si la complementarietat és perfecta o gairebé perfecta. El lloc més freqüent d'interacció entre el miRNA i el mRNA és el 3'-UTR, encara que s'ha descrit la unió del miRNA en les seqüències *open reading frame* (ORF) i com veurem a continuació, en el 5'-UTR (160, 161).

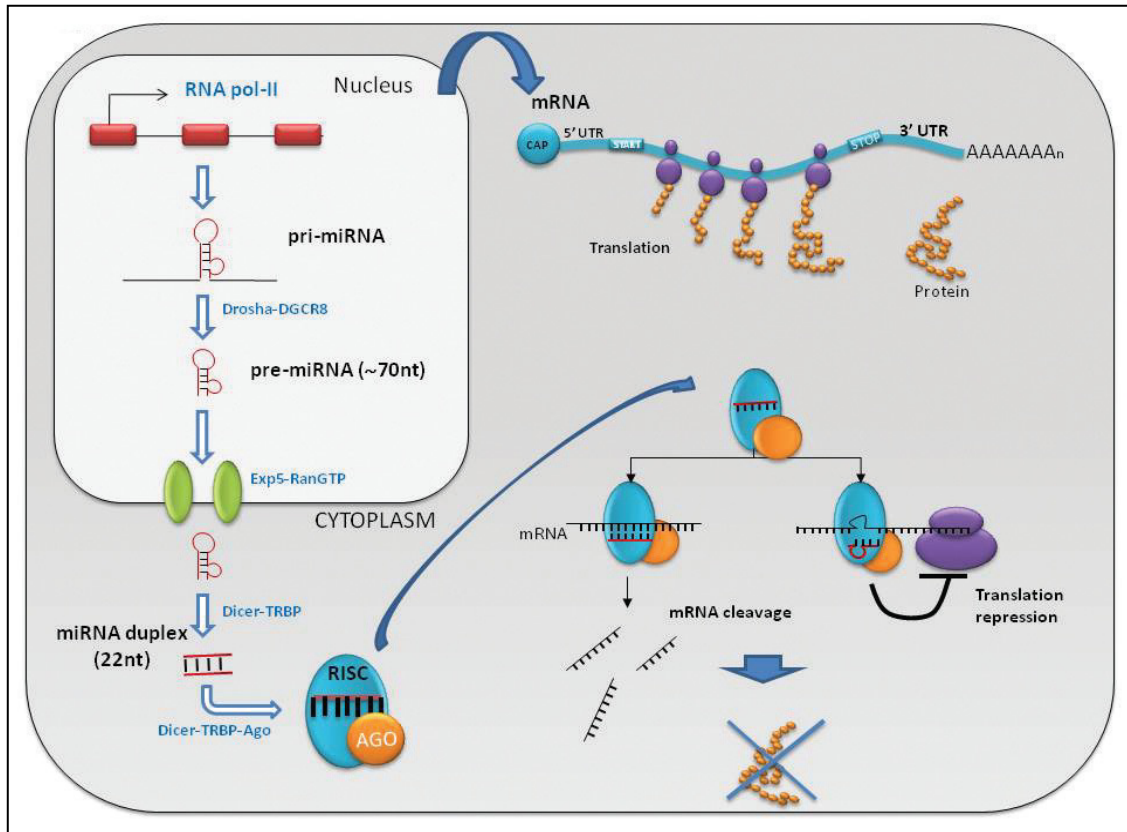


Figura 6. Esquema de la biogènesi dels miRNAs i la seva funció principal (162).

5.3. Funcions

La funció principal dels miRNAs és la d'inhibir la traducció d'un mRNA diana a proteïna. Aquest procés representa un mecanisme de regulació de l'expressió gènica a nivell post-transcripcional. D'aquesta manera, podríem dir que alts nivells d'expressió d'un miRNA van associats a baixos nivells d'expressió proteica, i a la inversa, nivells baixos d'un miRNA aniran associats a una més alta expressió de la proteïna. No obstant, més recentment, s'han conegut altres funcions secundàries dels miRNAs. Primer de tot, alguns miRNAs poden regular positivament la traducció de la proteïna, unint-se a l'extrem 5'-UTR del mRNA (163, 164). Els miRNAs també poden unir-se directament a proteïnes, en particular a proteïnes d'unió a RNA, i poden impedir la seva unió amb el seu RNA diana. Aquesta activitat dels miRNAs es coneix com a *decoy activity* i és independent del complex RISC (165). Finalment, els miRNAs poden també regular la transcripció gènica unint-se directament o modulant els patrons de metilació en el promotor d'un gen diana (166, 167).

5.4. Mecanismes de desregulació dels miRNAs en càncer.

Com s'ha comentat, varis miRNAs s'han vist desregulats en càncer. Una expressió anormal de miRNAs en càncer pot ocórrer per diferents mecanismes (168) .

Anormalitats genètiques

Les anomalies cromosòmiques poden ser un motiu de desregulació de miRNAs en càncer, ja que el procés de carcinogènesi moltes vegades s'associa a aberracions cromosòmiques com delecions, amplificacions i translocacions. Es pensa que una fracció important de gens de miRNAs estan localitzats en regions genòmiques associades a càncer o llocs fràgils (169).

La localització dels miRNAs en zones d'inestabilitat cromosòmica (amplificació, translocació o deleció) pot explicar part dels canvis en l'expressió de miRNAs observat entre teixits normals i tumorals (170).

Factors epigenètics

Hi ha factors epigenètics que també poden afectar l'expressió de miRNAs. En alguns càncers, la hipermetilació d'illes CpG en regions promotores resulta en el silenciament transcripcional hereditari de gens supressors de tumors. Anàlisis *in silico* han identificat illes CpG a prop de múltiples miRNAs, i alguns miRNAs s'han vist reprimits per hipermetilació CpG en teixit tumoral versus teixit normal (171, 172). A més, alguns miRNAs que tenen com a dianes les DNA metiltransferases podrien tenir un paper en contrarestar el silenciament per metilació de gens supressors de tumors observat en alguns càncers (173).

Regulació transcripcional

Varis factors de transcripció poden induir l'expressió de miRNAs activant la transcripció del pri-miRNA. Alguns d'aquests factors regulen l'expressió dels miRNAs de manera específica per teixit o per estadi de la malaltia. Molts oncogens o gens supressors de tumors poden actuar també com a factors de transcripció de varis miRNAs. Alguns exemples de miRNAs regulats per factors de transcripció són la família de miR-34, regulada per p53 (174), el *cluster* miR-17-92, regulat per Myc i E2F (175, 176) i miR-21, regulat per Stat3 (177).

Regulació en les vies de maduració dels miRNAs

En moltes ocasions, el nivell d'expressió d'un miRNA madur no es correspon amb el nivell d'expressió del seu precursor. Encara que els miRNAs d'un *cluster* generalment estan expressats a partir d'un pri-miRNA comú, els nivells dels

miRNAs individuals del *cluster* no són necessàriament els mateixos. Tot això indica que el processament i l'estabilitat dels miRNAs són punts que determinen els seus nivells d'expressió (178). Existeix evidència de que els nivells d'expressió de Dicer i Drosha estan alterats en varis càncers (179-181). Diferents nivells d'expressió d'aquestes proteïnes implicades en la maduració dels miRNAs podrien alterar els seus nivells finals.

Alteració de la funció del miRNA sense alteració del seu nivell d'expressió

Teòricament, un canvi en la seqüència del gen codificant per miRNA podria causar una alteració en la funció del miRNA, afectant a la unió amb la seva diana si la mutació és en la seqüència del miRNA madur, o afectant a la maduració del miRNA si és en el pre-miRNA. No obstant, degut a la petita mida dels miRNAs madurs, aquesta possibilitat no es creu que sigui un event freqüent (182, 183). En canvi, una variació en la seqüència del lloc d'unió del miRNA pot ocórrer amb més freqüència (184, 185) i podria jugar un paper important en càncer, ja que podria afectar a la interacció del miRNA amb el mRNA. Aquests conceptes es revisen més extensament en el capítol 6.

5.5. Paper dels miRNAs en CPCNP

Existeixen varis estudis a la literatura que mostren una correlació entre l'expressió de diferents miRNAs i el pronòstic de pacients en CPCNP. Addicionalment, alguns miRNAs podrien tenir un paper en el diagnòstic diferencial dels diferents subtipus de CPCNP. Per tant, els miRNAs podrien resultar útils com a biomarcadors per a poder estratificar el risc dels pacients amb CPCNP i predir la seva evolució, a més d'ajudar en la subclassificació histològica (186, 187). A continuació es mencionen els principals estudis en aquest camp.

Let-7 va ser el primer miRNA que va mostrar un paper en el desenvolupament del càncer de pulmó. La família de let-7 és un *cluster* de miRNAs, els gens dels quals es localitzen en diferents regions cromosòmiques freqüentment delecionades en càncer de pulmó (169). S'ha observat que la sobre-expressió de let-7 inhibeix el creixement cel·lular i redueix la progressió del cicle cel·lular (188). Estudis en pacients amb CPCNP han objectivat que una expressió reduïda del let-7 es correlaciona amb un pitjor pronòstic (189, 190). Aquestes observacions fan que s'hagi atribuït als miRNAs de la família de let-7 un paper com a supressors de tumors. A més, aquests miRNAs regulen múltiples oncogens, com *RAS* (191), *MYC*

(192), *HMG2* (193) i varis reguladors de la progressió del cicle cel·lular com *CDC25A*, *CDK6* i la ciclina D2 (188).

En pacients amb adenocarcinoma de pulmó, una expressió elevada de miR-155 i una expressió baixa de let-7a-2 s'ha correlacionat amb una pitjor supervivència (190). També s'ha descrit una firma de cinc miRNAs (miR-137, miR-372, miR-182*, miR-221 i let-7a) que es correlaciona amb la supervivència lliure de malaltia en pacients amb CPCNP (194). A més, alts nivells d'expressió de miR-146b s'han relacionat amb una pitjor supervivència en carcinoma escamós (195). De manera interessant, s'ha descrit una signatura de miRNAs que prediu la recaiguda en pacients afectes de CPCNP en estadi I (196). Un altre treball en pacients en estadi I va implicar uns nivells baixos de miR-221 amb una major probabilitat de recurrència (197). Existeix també una firma de 4 miRNAs que es va correlacionar amb la supervivència en pacients afectes de CPCNP en estadis I a IIIa (miR-486, miR-30d, miR-1 i miR-499) (198). Aquest últim treball té com a peculiaritat que l'estudi de miRNAs va ser fet en sèrum, pel que podria obrir el camp a una manera no invasiva de poder predir la supervivència del CPCNP.

El nostre grup també ha contribuït en el coneixement en aquest camp. En un estudi retrospectiu en 70 pacients afectes de CPCNP ressecat quirúrgicament i sense cap altre tractament adjuvant, una baixa expressió de miR-34a es va correlacionar amb una probabilitat major de recaiguda. A més, els pacients amb nivells baixos de miR-34a i amb mutacions de p53, van resultar tenir la probabilitat més alta de recaure (199). En un estudi posterior amb el mateix grup de pacients es va descriure que nivells alts de miR-16 es correlacionen amb una pitjor supervivència lliure de malaltia i supervivència global (200). MiR-34 i miR-16 tenen en comú que formen part de la via de p53. Aquesta activa l'expressió de miR-34 en resposta a un dany en el DNA, portant cap a una parada del cicle cel·lular o cap a apoptosi (174, 201). p53 també ha estat implicada en la via de biogènesi dels miRNAs i miR-16 s'ha relacionat en aquest procés de maduració dels miRNAs regulat per p53 (202, 203).

A part dels estudis on impliquen uns nivells baixos o alts de miRNAs amb un pronòstic diferent en CPCNP, hi ha estudis que intenten relacionar el pronòstic de malalts amb càncer amb diferents defectes en els components implicats en la biogènesi dels miRNAs. En CPCNP quirúrgic s'ha descrit que una expressió reduïda de Dicer es correlaciona amb una supervivència més curta (181).

Com s'ha dit anteriorment, a més del valor pronòstic, els miRNAs també podrien servir com a eina diagnòstica en CPCNP. Primerament, miR-205 ha estat descrit

com un marcador útil per a la diferenciació del carcinoma escamós del carcinoma no escamós, amb una sensibilitat de 96% i una especificitat del 90%, inclús en biòpsies petites de tumors poc diferenciats (204, 205). S'ha descrit també una firma de cinc miRNAs (miR-25, miR-34c-5p, miR-191, let-7e i miR-34a) que és capaç de diferenciar el carcinoma escamós de l'adenocarcinoma. A més, el nivell més baix d'expressió de la firma es correlacionà amb una pitjor supervivència en els pacients amb carcinoma escamós (206) . Finalment vull destacar un treball que proposa un panell de miRNAs (miR-21, miR-486, miR-375 and miR-200b) per a la detecció precoç de l'adenocarcinoma de pulmó en mostres d'esput (207).

| miRNA | Paper |
|---|---|
| Infraexpressió de let-7 | Pitjor supervivència (189,190) |
| Sobreexpressió de miR-155 o miR-146b | Pitjor supervivència en carcinoma escamós (195) |
| miR-137, miR-372, miR-182*, miR-221 i let-7a | Correlació amb supervivència lliure de malaltia (194) |
| Infraexpressió de miR-221 | Augment de la recurrència (197) |
| Firma varis miRNAs | Correlació amb recurrència en estadis I (196) |
| Firma en sèrum: miR-486, miR-30d, miR-1 i miR-499 | Correlació amb SG en estadis I-IIIa (198) |
| Firma: miR-25, miR-34c-5p, miR-191, let-7e i miR-34a | Marcador de carcinoma escamós i correlació amb SG (206) |
| Infraexpressió de miR-34a | Augment de la recurrència post-quirúrgica (199) |
| Sobreexpressió de miR-16 | Pitjor SG post-quirúrgica (200) |
| miR-205 | Marcador de carcinoma escamós (204,205) |

Taula 7. Principals miRNAs en CPCNP.

6. SNPs relacionats amb els miRNAs (miR-SNPs).

6.1. Concepte

Els miR-SNPs són una classe nova de polimorfismes presents en el genoma que poden interferir amb la funció dels miRNAs (208, 209). Si tenim en compte que els miRNAs poden regular l'expressió de múltiples gens i vies importants en càncer i que un guany o una pèrdua de la funció dels miRNAs s'ha associat al pronòstic i a la progressió de la malaltia, podem pensar que un SNP present en un gen de miRNA, en un component de la via de maduració o en una zona diana del propi miRNA, podria alterar la funció normal d'aquests i podria tenir implicacions importants en càncer (209). A més, un simple miR-SNP podria afectar potencialment l'expressió de múltiples gens involucrats en diferents vies.

La demostració inicial de que un SNP relacionat amb miRNA pot afectar el fenotip va ser descrita per Abelson i col·laboradors, que van observar que una mutació en el lloc d'unió de miR-189 a *SLITRK1* s'associava amb la síndrome de Tourette (210). Des de llavors, varis treballs han associat alguns miR-SNPs amb diverses malalties, incloent el càncer, i també s'ha vist que poden influenciar la resposta a fàrmacs, afectant l'expressió d'alguns gens diana (211-214).

6.2. Classificació dels miR-SNPs i paper pronòstic en càncer

Primerament hem de tenir present que no totes les variacions en la seqüència d'un miRNA són degudes a SNPs, ja que també s'han descrit altres tipus de canvis com insercions, delecions, amplifacions o translocacions cromosòmiques que poden portar a un guany o pèrdua de la funció del miRNA (209). Aquí ens centrem en les variacions polimòrfiques causades per un SNP.

SNPs en gens codificants per miRNA

Estan localitzats en el pri-miRNA, pre-miRNA, o bé en la seqüència madura del miRNA. Aquests SNPs podrien potencialment afectar l'expressió de múltiples gens i vies, influir en el processament del miRNA i alterar els seus nivells finals. Els SNPs que estan localitzats en la pròpia seqüència d'unió al mRNA (coneguda com a *seed sequence*) podrien alterar el reconeixement específic de la diana.

Com hem dit anteriorment amb les mutacions, un SNP en un gen codificant per miRNA i especialment per la seva *seed sequence*, és rar (215, 216). Es pensa que aquests SNPs en gens de miRNA afecten la funció del miRNA per varis mecanismes. Primer, a través de la modulació de la transcripció del transcrit

primari; segon, pel processament del pri-miRNA i del pre-miRNA; per últim, per un efecte en la interacció del miRNA amb el mRNA, ja que es poden crear o destruir llocs d'unió.

La primera evidència que una mutació puntual en un gen de miRNA pot tenir un efecte funcional i afectar a la susceptibilitat al càncer prové d'un estudi que va descriure una mutació germinal en el pri-mir-16-1 en una família amb leucèmia limfàtica crònica familiar, i que resultava en uns nivells baixos d'expressió de miR-16-1 (217). Posteriorment la mutació va ser descrita en un tipus de ratolins negres que espontàniament desenvolupen leucèmia limfàtica crònica (218). També s'ha descrit que SNPs en regions primàries de let-7e i mir-16 condueixen a uns nivells del miRNA madur inferiors (217, 219).

Existeix també evidència d'estudis casos-control d'una associació entre un SNP en pre-mir-196a-2 (rs11614913) amb el risc de desenvolupar càncer de mama (220), pulmó (221), gàstric (222) i de cap i coll (223). Aquest SNP està localitzat en el precursor de mir-196-a-2 i possiblement afecta la maduració del miRNA i també la interacció amb els mRNAs diana. Aquest mateix SNP ha estat associat a una pitjor supervivència en CPCNP (224). Un SNP en el pre-mir-423, rs6505162, s'ha associat a risc augmentat de càncer de bufeta (225) i una disminució del risc de càncer d'esòfag (109). El SNP localitzat al pre-mir-146a, rs2910164, s'ha vist que altera el processament del miRNA, alterant l'expressió de la seqüència madura i predisposant al càncer papil·lar de tiroides (226, 227). En altres estudis el mateix polimorfisme s'ha associat a un risc incrementat de càncer de pròstata (228) o carcinoma hepatocel·lular, a través d'una reducció dels nivells d'expressió de miR-146a (229).

Aquests estudis mencionats i també altres de similars mostren com un simple canvi genètic pot influenciar en el perfil d'expressió gènica i mostren que variacions genètiques en miRNAs poden ser un event oncogènic (230).

SNPs en llocs d'unió del miRNA al mRNA

Teòricament, un SNP localitzat en la zona 3'UTR d'un gen diana pot tenir un efecte més concret i limitat que els altres tipus, ja que impacta únicament en el mRNA codificat i els seus efectors per sota de la via. Com s'ha mencionat, aquests polimorfismes són més abundants en el genoma.

També existeixen variacions genètiques en el mRNA diana que no estan justament en la seqüència d'unió amb el miRNA sinó que estan properes i que es

pensa que poden tenir un efecte alterant l'accessibilitat del propi miRNA. Hi ha mutacions que poden crear o suprimir una estructura secundària propera al lloc d'unió del miRNA i poden afectar la repressió de la traducció del gen diana mitjançada per miRNAs alterant la seva accessibilitat al lloc d'interacció (231).

Teòricament, un SNP present en la seqüència 3'-UTR del mRNA, que és el lloc d'unió per a miRNAs, podria destruir el lloc d'unió, impedit la funció normal del miRNA, o bé, crear un lloc nou d'unió per miRNAs. Si tenim en compte que let-7 té com a diana el gen *KRAS*, i que els dos són importants en la patogènia del CPCNP (191), és rellevant la troballa d'un SNP localitzat en la zona 3'-UTR de *KRAS* que incrementa el risc de desenvolupar CPCNP en fumadors (232). Un estudi va objectivar que les freqüències al·lèliques de varis SNPs d'aquest tipus són diferents en el cas de pacients amb càncer respecte a la població normal (184).

Perquè un SNP en un lloc d'unió de miRNAs pugui ser considerat funcional, primer de tot s'hauria de demostrar l'associació del SNP amb malaltia i en segon terme, s'hauria de demostrar que els canvis al·lèlics condueixen a una diferent interacció del SNP amb el mRNA i això comporta canvis en l'expressió del gen diana. A part del paper com a marcadors pronòstics, també s'estan realitzant estudis que demostren que aquests SNPs poden tenir un paper en la resistència a fàrmacs (230).

SNPs en gens implicats en el processament del miRNA.

Aquesta classe de SNPs podrien alterar l'expressió de proteïnes implicades en la biogènesi dels miRNAs, com Drosha, Dicer o exportina-5. Es pensa que alterant aquests components de la maquinària de processament dels miRNAs es podria alterar la regulació global mitjançada per miRNAs en la cèl·lula, ja que es veuria afectat la normal producció de miRNAs.

S'han descrit SNPs en el complex *DROSHA*, en el complex d'exportació (*RAN* i *XPO5*), en el complex *DICER* i en el complex *RISC*. Alguns d'aquests SNPs han estat descrits com a marcadors de risc per a diferents càncers com el d'esòfag (109), bufeta (225), ronyó (233) i pròstata (234). Un SNP a *AGO1* ha estat descrit com a modulador de la susceptibilitat al càncer de pulmó (235). De manera interessant, un SNP a *RNASEN* (que codifica per a Drosha) s'ha vist que afecta a la supervivència de pacients amb CPCNP (236).

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi

El càncer de pulmó és la neoplàsia més freqüent en el moment actual i és la primera causa de mort per càncer en el món. Aproximadament el 85 % dels pacients presenten CPCNP. Inclús els casos identificats en estadis precoços i en què es pot realitzar un tractament quirúrgic curatiu, tenen un risc de recaiguda global del 60%. A pesar dels avenços en el tractament de la malaltia realitzats durant els darrers anys, la supervivència global continua essent molt baixa, al voltant del 15 % als 5 anys. És per aquest motiu que es fa necessària la troballa de biomarcadors que puguin predir el risc de recaiguda, una vegada realitzada la resecció quirúrgica. Aquests biomarcadors ens permetrien estratificar els pacients pel seu risc i individualitzar el seguiment i el tractament de la malaltia, especialment en els pacients en estadi I que no reben cap tractament adjuvant.

La majoria de pacients amb CPNCP són fumadors i durant els últims anys s'ha observat que variants polimòrfiques d'enzims relacionats amb la metabolització de carcinògens del tabac, en gens de reparació del DNA o en gens relacionats amb l'expulsió de carcinògens de la cèl·lula s'han associat a un risc augmentat de càncer de pulmó. No obstant, l'impacte d'aquests SNPs en la recaiguda del CPCNP no ha estat establert. Si tenim en compte que els SNPs són característiques innates dels individus, podríem pensar que la seva presència podria tenir un efecte també en la recaiguda de pacients fumadors que han desenvolupat un càncer de pulmó, ja que les diferències genotípiques es podrien traduir en diferències en el procés de malignització mediat pel tabac. Aquests SNPs doncs podrien seleccionar-nos individus que han tingut un risc incrementat de càncer de pulmó i que, una vegada realitzat un tractament local quirúrgic, podrien tenir un risc augmentat de recidivar.

Per altre banda recentment els miRNAs han esdevingut com a elements claus en el procés de carcinogènesi. Els miRNAs són molècules que controlen la diferenciació i el creixement cel·lular i en diferents tipus tumorals s'associen a l'evolució de la malaltia. Polimorfismes en gens relacionats amb miRNAs implicats en càncer o en els propis miRNAs poden jugar un paper en la progressió tumoral. Més concretament, polimorfismes en gens de la via de processament dels miRNAs o en la seqüència del pri-miRNA o pre-miRNA poden afectar als nivells finals de determinats miRNAs. A més, polimorfismes en les seqüències d'anclatge de miRNAs poden reprimir la

inhibició dels gens diana per aquests i per tant, afectar la seva funció. En definitiva, polimorfismes relacionats amb els miRNAs podrien modificar el risc de recaiguda després de la cirurgia en pacients amb CPCNP.

Basant-nos en aquestes hipòtesis ens plantegem els següents objectius:

Objectiu general

Trobar biomarcadors de recaiguda i supervivència global en pacients quirúrgics de CPCNP basant-nos en l'estudi de les variants polimòrfiques del DNA.

Objectius específics

1. Analitzar, en una sèrie retrospectiva de pacients amb CPCNP quirúrgics, polimorfismes en gens relacionats amb el metabolisme del tabac (fase I i fase II), gens de reparació del DNA i en el gen *MDR1/ABCB1* en pacients amb hàbit tabàquic.
2. Analitzar polimorfismes presents en regions del DNA codificants per miRNAs relacionats amb proliferació, apoptosi, angiogènesi i cicle cel·lular en una sèrie retrospectiva de pacients amb CPCNP quirúrgics.
3. Analitzar polimorfismes presents en els gens que intervenen en el procés de maduració dels miRNAs en una sèrie retrospectiva de pacients amb CPCNP quirúrgics.
4. Analitzar polimorfismes localitzats al lloc d'anclatge del miRNA al mRNA en una sèrie retrospectiva de pacients amb CPCNP quirúrgics.
5. Establir si existeix relació entre els diferents genotips i el temps a la recaiguda o la supervivència global.

III. PRIMER TREBALL

Single nucleotide polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes and prognosis in resected non-small-cell lung cancer.

Campayo M, Viñolas N, Navarro A, Carcereny E, Casas F, Gel B, Diaz T, Gimferrer JM, Marrades RM, Ramirez J, Monzo M.

J Surg Res 2011;167:e5-e12

El càncer de pulmó és la neoplàsia més freqüent a nivell mundial si considerem conjuntament els dos sexes i és la primera causa de mort per càncer. Els carcinògens presents en el fum del tabac poden causar un dany en el DNA si no són inactivats o expulsats de la cèl·lula. SNPs en gens relacionats amb el metabolisme dels carcinògens del tabac, en la reparació del DNA o en *MDR1* han estat relacionats amb la susceptibilitat a desenvolupar CPCNP. No obstant, el paper d'aquests SNPs en la recaiguda del CPCNP no ha estat establert. Si tenim en compte que els SNPs són característiques innates dels individus, podríem pensar que la seva presència podria tenir un efecte també en la recaiguda de pacients fumadors que han desenvolupat un càncer de pulmó, ja que les diferències genotípiques es podrien traduir en diferències en el procés de malignització mediat pel tabac. Per això, vam analitzar 13 SNPs en 4 gens de metabolització (*CYP2C8*, *GSTP1*, *EPOXH1* i *NAT2*), 5 gens de reparació del DNA (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *XPA* i *XPC*) i en el gen *MDR1* i vam correlacionar els genotips amb el temps a la recaiguda (TR) i amb la supervivència global (SG) en 71 pacients fumadors o ex-fumadors afectes de CPCNP ressecat quirúrgicament.

El DNA es va obtenir de teixit tumoral fixat en formol i inclòs en parafina. L'anàlisi dels SNPs en els gens escollits es va realitzar per discriminació al·lèlica. Per avaluar l'associació entre el TR i la SG amb els SNPs analitzats es van utilitzar els mètodes de Kaplan i Meier, el test log-rang i l'anàlisi multivariant de Cox.

Els pacients amb els genotips *XPC* rs2228001 *wild-type* (WT), *CYP2C8* rs10509681 WT o *NAT2* rs1799930 no WT van tenir un TR més llarg. Els pacients amb el genotip *ERCC1* rs735482 WT van mostrar una tendència no significativa a un TR més llarg. No es van trobar altres relacions entre els SNPs i el TR. Els pacients que tenien almenys dos genotips desfavorables en aquests 4 gens van tenir un TR més curt i també una SG més curta que els pacients amb només un genotip desfavorable o cap. En l'anàlisi

multivariant, el genotip *XPC* rs2228001 no WT i la presència d'almenys 2 genotips desfavorables van resultar ser marcadors independents per un TR més curt.

Vam concloure que la presència de SNPs en gens de metabolització del tabac i en gens de reparació del DNA podrien tenir importància en l'evolució del CPCNP tractat quirúrgicament.

Single Nucleotide Polymorphisms in Tobacco Metabolism and DNA Repair Genes and Prognosis in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer

Marc Campayo, M.D.,* Nuria Vinolas, M.D., Ph.D.,* Alfons Navarro, Ph.D.,† Enric Carcereny, M.D.,‡ Francesc Casas, M.D., Ph.D.,§ Bernat Gel, M.Sc.,k Tania Diaz, M.Sc.,† Josep Maria Gimferrer, M.D., Ph.D.,{ Ramon M. Marrades, M.D., Ph.D.,# Jose Ramirez, M.D., Ph.D.,** and Mariano Monzo, M.D., Ph.D.†¹

*Department of Medical Oncology, ICMHO, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; †Human Anatomy and Embryology Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; ‡Department of Medical Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; §Radiation Oncology Department, ICMHO; Hospital Clinic, Barcelona, Spain; kSoftware Department, Universitat Politècnica de Catalunya, UPC-BarcelonaTech, Barcelona, Spain; {Department of Thoracic Surgery, ICT, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; #Department of Pneumology, ICT, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, CIBERES, Barcelona, Spain; and **Department of Pathology, CDB, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, CIBERES, Barcelona, Spain

Submitted for publication October 22, 2010

Background. If tobacco-related carcinogens are not inactivated or extruded from the cell, they can damage the DNA. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in tobacco metabolism, DNA repair, and multidrug resistance have been related to lung cancer susceptibility. We examined 13 SNPs in 10 of these genes and correlated the results with time to progression (TTP) and overall survival (OS) in 71 smoker or former smoker patients with resected non-small-cell lung cancer (NSCLC).

Materials and Methods. DNA was obtained from paraffin-embedded tumor. SNP analysis of the candidate genes was performed by allelic discrimination assay. Log-rank test, Kaplan-Meier plots, and Cox multivariate analysis were used to evaluate the association of TTP and survival with the SNPs evaluated.

Results. Patients with wild-type (wt) XPC rs2228001, wt CYP2C8 rs10509681, or non-wt NAT2 rs1799930 had a longer TTP. Patients with wt ERCC1 showed a non-significant trend towards longer TTP. No other relation between SNPs and TTP were observed. Patients harboring at least two unfavorable genotypes in these four genes had a shorter TTP and OS than patients with either one or no unfavorable genotypes. In the multivariate analysis, non-wt XPC rs2228001 and the

presence of at least two unfavorable genotypes emerged as independent markers for shorter TTP.

Conclusions. SNPs in tobacco metabolism and DNA repair genes may influence the clinical outcome of resected NSCLC. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: SNP; polymorphisms; tobacco metabolism; DNA repair; lung cancer; NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer is the most frequent solid tumor and the first cause of cancer death worldwide [1]. Early stage non-small-cell lung cancer (NSCLC) is considered a potentially curable disease following complete surgical resection and tumor stage is the most important clinical prognostic factor [2]. Nevertheless, even after complete resection, an important number of patients will relapse (20%–75%, depending on tumor stage) [2]. Adjuvant cisplatin-based chemotherapy after surgical resection has been shown to be effective in stages II and III NSCLC and has, therefore, been standard treatment since 2004 [3]. Postoperative radiotherapy may also be administered if N2 involvement is present, but its impact on survival is not clearly defined [4].

Tobacco smoking is the major cause of lung cancer. There are more than 60 known carcinogens in cigarette smoke, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, and nitrosamines [5]. Many of these compounds are converted into reactive metabolites by

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Human Anatomy and Embryology Unit, University of Barcelona, School of Medicine, Casanova, 143, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mmonzo@ub.edu.



phase I or phase II metabolic enzymes and, if not inactivated, they can react with DNA and form DNA-adducts [6, 7]. The DNA structure can still be restored by cellular repair mechanisms [8], but if the adducts escape repair, they are capable of inducing mutations and initiating tumorigenesis. Various genes are involved in the process of tobacco-related carcinogenesis and DNA repair, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes can affect lung cancer development.

CYP2C8 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8) is a member of P450 cytochrome involved in phase I metabolism, and has been related to the metabolism of benzo[a]pyrene, a major carcinogen present in cigarette smoke [9]. GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1) and EPOXH1 (microsomal epoxide hydrolase 1) are enzymes involved in phase II metabolism of various carcinogens, including aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons [10, 11]. NAT2 (N-Acetyltransferase-2) is involved in the activation and inactivation of numerous xenobiotics, including aromatic amines [12]. Various SNPs in these tobacco metabolizing enzymes can affect the catalytic activity of the enzyme, changing the rate at which tobacco-related carcinogens become activated or detoxified and thus modulating the risk of tobacco-related cancers [13–15]. Several studies have shown a relationship between genotypes and susceptibility to lung cancer and other tobacco-related cancers [16–21].

Excision-repair cross-complementing (ERCC) 1, ERCC2, ERCC5, xeroderma pigmentosum (XP) A, and XPC are involved in different DNA repair pathways. Briefly, XPA and XPC are sensor proteins that recognize the damage; ERCC2 is a helicase that opens the double-helix DNA; ERCC1 and ERCC5 are

endonucleases that cleave the damaged DNA and remove the fragment containing the lesion [8, 22]. These mechanisms play an important role in tobacco-induced carcinogenesis, since genetic variations in DNA repair genes modulate DNA repair capacity and may be related to lung cancer susceptibility [23–25]. SNPs in these genes contribute to inter-individual diversity in DNA repair capacity, since they can affect the ability to delete the DNA-adducts. Lung cancer patients have been found to have lower DNA repair capacity than healthy individuals [26, 27].

Multidrug resistance 1 (MDR1) encodes for p-glycoprotein, a transmembrane protein of the ATP binding cassette family that transports various molecules from the cytosol to the extracellular space in order to reduce the accumulation of toxic substances in the cell [28]. Various SNPs in MDR1 have been associated with p-glycoprotein activity [29, 30]. P-glycoprotein expression in lung tissue has been described, suggesting a defensive role against different substrates, especially hydrophobic agents like benzopyrene and other agents found in cigarette smoke [31, 32]. A SNP in the 3' untranslated region of the MDR1 has been related to lung cancer risk [33].

Although several studies have shown an association between lung cancer risk and SNPs in genes related to tobacco metabolism, DNA repair, and multidrug resistance, their impact on disease relapse has not been established. Because SNPs are innate characteristics of individuals, we hypothesized that their presence could have an effect even after tumor resection and, thus, be useful as prognostic markers. In order to investigate this possibility, we examined 13 SNPs in 10 of these genes and correlated our findings with time to progression (TTP) and overall survival (OS).

TABLE 1
Context Sequence and NCBI rs Code for Each Polymorphism

| Gene | Context sequence | Change | rs NCBI |
|----------------------|----------------------------|------------|----------|
| Tobacco metabolism | | | |
| CYP2C8 | AGGAAATTCT[T/C]TGTCATCATG | Lys399Arg | 10509681 |
| GSTP1 | CTGCAAATAC[A/G]TCTCCCTCAT | Ile105Val | 1695 |
| EPOXH1 | CCCGCAGGCC[A/G]TACCCGAAG | His139Arg | 2234922 |
| EPOXH1 | TCTCAACAGA[C/T]ACCCTCACTT | Tyr113His | 1051740 |
| NAT2 | CTTGAACCTC[G/A]AACAATTGAA | Arg197Gln | 1799930 |
| DNA repair | | | |
| ERCC1 | CCCAAAGGGA[A/C]AGAAACCTTC | Lys259Thr | 735482 |
| ERCC2 | TCTATCCTCT[G/T]CAGCGTCTCC | Lys751Gln | 13181 |
| ERCC5 | CTTTCAGCAT[C/G]TTCACTTGAA | Asp1104His | 17655 |
| ERCC5 | GGGATCGCCA[C/T]GGGAACCTCAA | His46His | 1047768 |
| XPA | GGAGTGGGCC[A/G]GAGATGGCGG | 5'UTR | 1800975 |
| XPC | CCCATTTGAG[A/C]AGCTGTGAGC | Lys939Gln | 2228001 |
| Multidrug resistance | | | |
| MDR1 | GAGAGAAATC[A/G]TAGTTTAAAC | 3'UTR | 3842 |
| MDR1 | TCTTGAAGGG[C/T]CTGAACCTGA | Gly412Gly | 1128503 |

NCBI = National Center for Biotechnology Information.

TABLE 2

DNA Isolation and SNP Analysis

Patient Characteristics

| Characteristics | Value | n (%) |
|--------------------|------------------------------|------------|
| Gender | Male | 68 (95.8%) |
| | Female | 3 (4.2%) |
| Age | ≤65 | 35 (49.3%) |
| | >65 | 36 (50.7%) |
| Performance Status | 0 | 15 (21.1%) |
| | 1 | 54 (76.1%) |
| | 2 | 2 (2.8%) |
| Stage | Ia | 15 (21.1%) |
| | Ib | 22 (31%) |
| | IIa | 5 (7%) |
| | IIb | 17 (23.9%) |
| | IIIa | 12 (16.9%) |
| Histology | Adenocarcinoma | 31 (43.7%) |
| | Squamous cell carcinoma | 37 (52.1%) |
| | Large cell carcinoma | 2 (2.8%) |
| | Bronchioloalveolar carcinoma | 1 (1.4%) |
| Smoking History | Current smoker | 41 (57.7%) |
| | Former smoker | 30 (42.3%) |
| Type of surgery | Lobectomy | 43 (60.6%) |
| | Pneumonectomy | 24 (33.8%) |
| | Atypical resection | 1 (1.4%) |
| | Bilobectomy | 3 (4.2%) |
| Relapse | No | 35 (49.3%) |
| | Yes | 36 (50.7%) |

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Seventy-one smoker or former smoker patients with NSCLC who underwent complete surgical resection between March 1996 and September 2002 were included. All patients had an Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (PS) 0-2; age > 18 y and adequate organ function. No patient received chemotherapy. Six patients with mediastinal nodal involvement (pN2) underwent post-operative radiotherapy and three patients received thoracic radiotherapy for chest wall involvement. Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.

SNPs in 10 genes were analyzed: (CYP2C8, GSTP1, EPOXH1, NAT2, ERCC1, ERCC2, ERCC5, XPA, XPC, MDR1) (Table 1). DNA was obtained from paraffin-embedded tumor tissue using DNeasy tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's pro-tocol. Primers and probes were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA) Assays-on-Demand SNP genotyping product. In accordance with the supplier's instructions, the primers and probes were designed for the regions of DNA shown in Table 1. SNP analysis of the candidate genes was performed by allelic discrimination on ABI Prism 7500 Sequence Detection System as previously described [34].

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using PAS W Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). TTP was calculated from the time of surgical treatment to the date of relapse or last follow-up. OS was calculated from the time of surgical treatment to the date of death or last follow-up. After surgery, patients without tumor progression were followed every 3 mo for 2 y, then every 6 mo until 5 y after surgery, and then annually. The log-rank test and Kaplan-Meier plots were used to evaluate the association of TTP and OS with each of the SNPs and clinical variables. A Cox multivariate analysis (backwards method with the Wald statistic) was used to calculate the independent relative risks for TTP and OS. The level of significance was set at ≤ 0.05 .

RESULTS

Patient Characteristics

All 71 patients were included in all the analyses of SNPs. Sixty-eight (95.8%) patients were male. Median age was 64 y (range, 36–86). Sixty-nine (97.2%) patients had PS 0-1. Forty-one (57.7%) were active smokers and 30 (42.3%) were former smokers. The mean pack-year dose was 60. Median follow-up was 38.4 mo (range, 3–158). After a follow-up of 158 mo, disease relapse had occurred in 36 (50.7%) patients. Table 2 summarizes the main patient characteristics.

SNPs, TTP, and OS

Given the distribution of the allelic frequencies found (Table 3), patients were divided into wild-type (wt) and

TABLE 3

Genotypic Frequencies, TTP, and Log-Rank P Value for the Four SNPs with an Impact on TTP

| Gene | Genotype | n | Frequency (%) | Mean TTP, months | P value | RR (95% CI) |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------|---------------|------------------|---------|------------------|
| CYP2C8 rs10509681 n = 71 | wt (TT) | 55 | 77.5 | 88.24 | 0.05 | 2.02 (0.99–4.14) |
| | non-wt (CT/CC) | 16 (13/3) | 22.5 | 43.2 | | |
| | XPC rs2228001 n = 68* | wt (AA) | 45 | 66.2 | | |
| non-wt (AC/CC) | 23 (8/15) | 33.8 | 45.26 | | | |
| NAT2 rs1799930 n = 65* | wt (GG) | 46 | 70.8 | 61.15 | 0.006 | 3.53 (1.36–9.17) |
| non-wt (AG/AA) | 19 (17/2) | 29.2 | 111.43 | | | |
| ERCC1 rs735482 n = 71 | wt (AA) | 47 | 66.2 | 87.39 | | |
| non-wt (AC/CC) | 24 (9/15) | 33.8 | 51.76 | | | |

*In some patients the genotype could not be determined.

non-wt, with non-wt patients including those with either the heterozygous or the homozygous SNP. Significant differences in TTP were found according to SNPs in XPC rs2228001 (AA versus AC/CC; $P = 0.012$), CYP2C8 rs10509681 (TT versus CT/CC; $P = 0.05$), and NAT2 rs1799930 (GG versus AG/AA; $P = 0.006$) (Fig. 1, Table 3) A nonsignificant trend towards a longer mean TTP was observed in patients with wt ERCC1 rs735482 (AA versus AC/CC; $P = 0.089$). No additional differences in TTP and no differences in OS were observed when patients were analyzed according to the individual genotypes (Appendix Table 1).

Combinations of Genotypes

To explore the potential accumulative effect of the four genotypes with an impact on TTP, we analyzed the impact of the four unfavorable genotypes in

combination (non-wt CYP2C8 rs10509681, non-wt XPC rs2228001, wt NAT2 rs1799930, and non-wt ERCC1 rs735482). Mean TTP was 41.34 mo for patients harboring two or more unfavorable genotypes, compared to 111.22 mo for patients with one or no unfavorable genotypes ($P = 0.002$) (Fig. 2A, Table 4). Moreover, OS was also shorter for those patients with two or more unfavorable genotypes compared with patients with one or no unfavorable genotypes (46.64 versus 91.09 mo, respectively) ($P = 0.033$) (Fig. 2B, Table 4).

Multivariate Analyses

In the Cox multivariate analysis including clinical variables (age, PS, stage) and each of the four genotypes (CYP2C8, NAT2, XPC, ERCC1), XPC rs2228001 emerged as the most important factor influencing TTP (relative risk [RR] = 2.12 for non-wt XPC

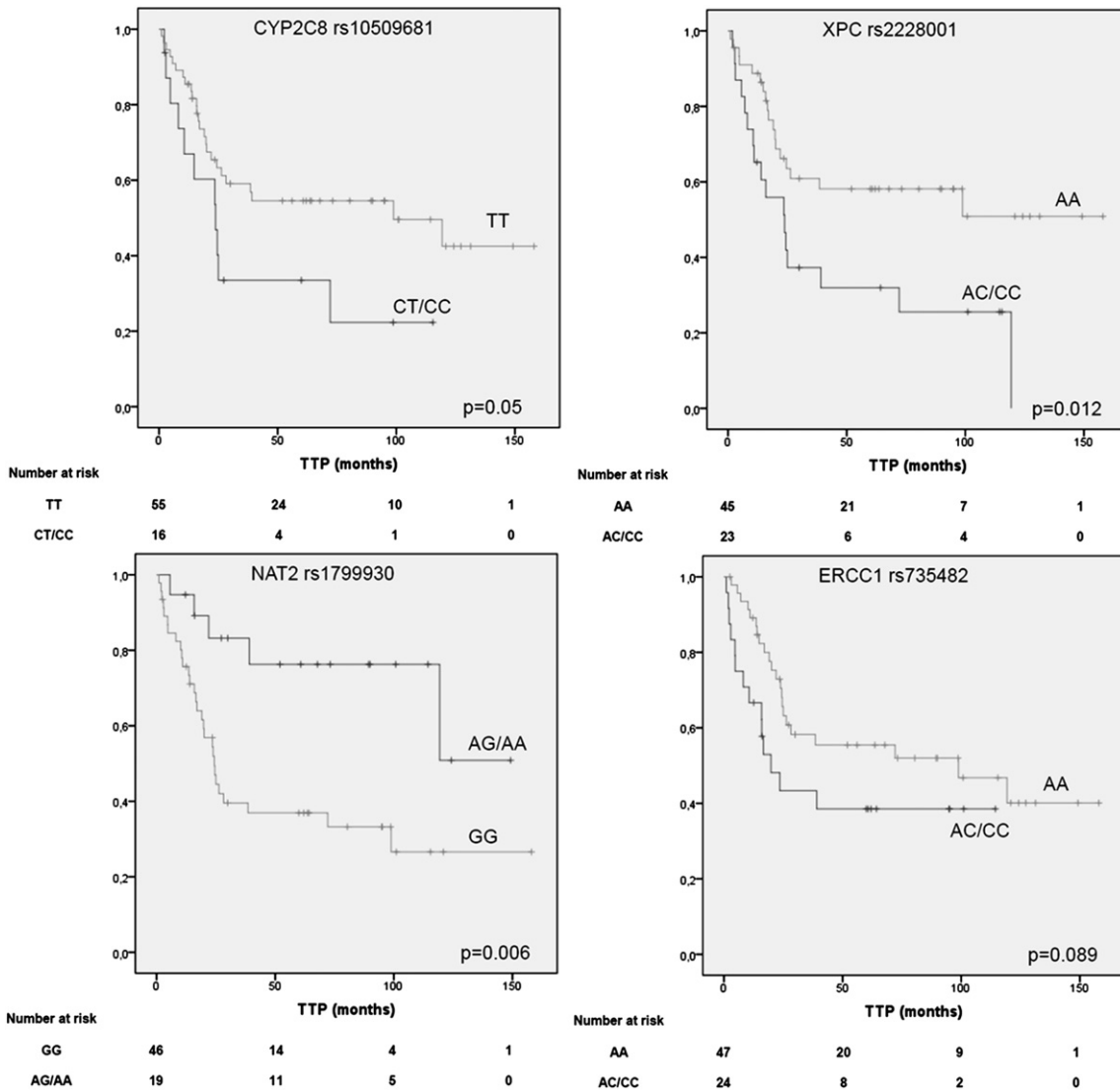


FIG. 1. TTP according to SNP genotype.

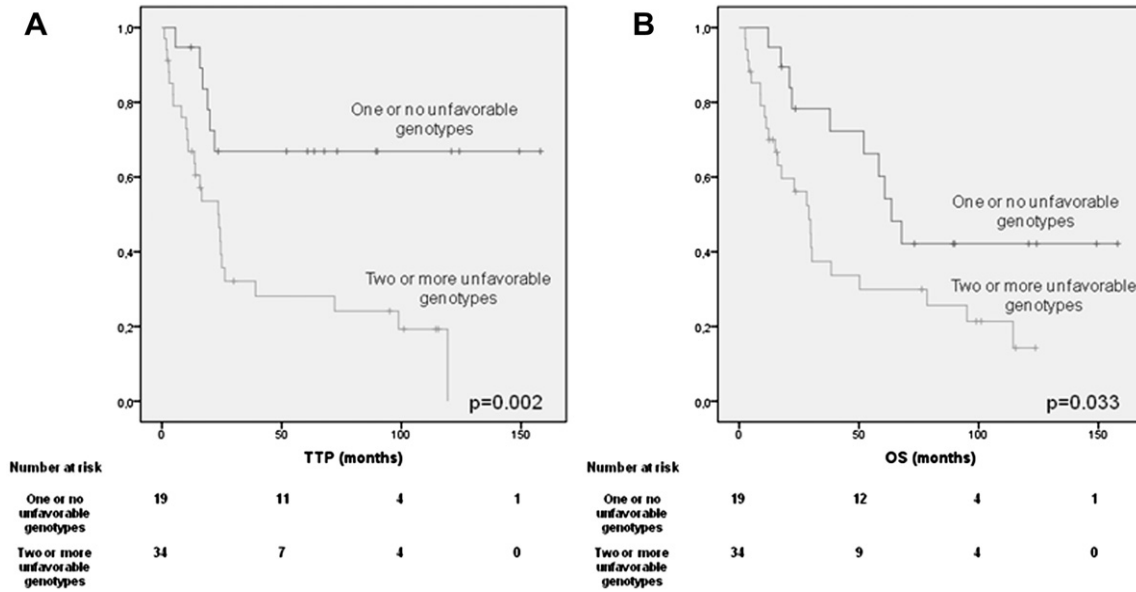


FIG. 2. TTP (A) and OS (B) according to combinations of genotypes.

rs2228001; P = 0.036) (Table 5). No influence on TTP was observed according to stage (I versus II or IIIa), PS (0 versus 1 or 2), or age (< 65 versus >65 y). The most important factors influencing OS were age > 65 (RR = 3.92; P = 0.002); PS 1 or 2 (RR = 2.89; P = 0.019); stages II or IIIa (RR = 4.62; P = 0.001), and non-wt ERCC1 rs735482 (RR = 2.12; P = 0.042) (Table 5). When the Cox multivariate analysis included the combinations of unfavorable genotypes, the most important factors influencing TTP were stage II or IIIa (RR = 3.77; P = 0.001) and the presence of two or more unfavorable genotypes (RR = 4.99; P = 0.001) (Table 5). Age > 65 (RR = 3.82; P = 0.011) and stage II or IIIa (RR = 6.36; P < 0.01) were prognostic factors for shorter OS, while the combination of unfavorable genotypes did not influence OS.

DISCUSSION

In the present study, we analyzed SNPs in phase I and phase II tobacco metabolism genes, DNA repair

TABLE 4
Combinations of Genotypes

| Number of unfavorable genotypes | n | Mean TTP, months | P value | Mean OS, months | P value |
|---------------------------------|----|------------------|---------|-----------------|---------|
| One or none | 19 | 111.22 | 0.002 | 91.09 | 0.033 |
| Two or more | 34 | 41.34 | | 46.64 | |

Unfavorable genotypes were non-wt CYP2C8 rs10509681, non-wt XPC rs2228001, wt NAT2 rs1799930, and non-wt ERCC1 rs735482.

genes, and MDR1 in smoker or former smoker patients with early stage NSCLC treated with surgical resection only. This homogeneous series made it possible to study the effect of the SNPs without the need to account for the possible influence of chemotherapy. In the univariate analysis, patients with wt CYP2C8 rs10509681 and those with wt XPC rs2228001 had a longer TTP than non-wt patients. However, patients harboring non-wt NAT2 rs1799930 had a longer TTP than wt patients. Furthermore, we found that patients harboring at least two unfavorable genotypes had a shorter TTP and OS than patients with either one or no unfavorable genotypes. In the multivariate analyses, non-wt XPC rs2228001 and the presence of at least two unfavorable genotypes had an independent adverse effect on TTP.

Carcinogens contained in cigarette smoke are converted into reactive metabolites that can interact and damage the DNA. SNPs in genes involved in these metabolic reactions can affect the activity of the respective enzyme and modify the level of the reactive molecules generated. In the present study, the SNP in CYP2C8 rs10509681 was a risk factor for shorter relapse. Several SNPs have been described in the CYP2C8 gene, with different frequencies among populations. CYP2C8 rs10509681 is located in exon 9 and has been related to a defective metabolism of paclitaxel [35], although it is not known if it is also involved in the risk of lung cancer development. In contrast, patients with wt NAT2 rs1799930 had a shorter TTP than those with the SNP. This SNP is located in exon 2 of the gene. Acetyltransferases are polymorphic enzymes encoded by NAT1 and NAT2 genes, involved in the metabolism of aromatic amines. There are several allelic

TABLE 5
Multivariate Analyses

| Variable | RR (95% CI) | P value |
|--|-------------------|---------|
| TTP | | |
| Analysis with each genotype separately | | |
| Stage II or IIIa | 1.89 (0.92–3.9) | 0.082 |
| XPC non-wt | 2.12 (1.05–4.27) | 0.036 |
| NAT2 wt | 2.55 (0.95–6.85) | 0.064 |
| Analysis with the combination of genotypes | | |
| Stage II or IIIa | 3.77 (1.76–8.07) | 0.001 |
| Two or more unfavorable genotypes | 4.99 (1.94–12.81) | 0.001 |
| OS | | |
| Analysis with each genotype separately | | |
| Age >65 | 3.92 (1.62–9.45) | 0.002 |
| PS 1 or 2 | 2.89 (1.19–7.01) | 0.019 |
| Stage II or IIIa | 4.62 (1.92–11.11) | 0.001 |
| ERCC1 non-wt | 2.12 (1.03–4.4) | 0.042 |
| Analysis with the combination of genotypes | | |
| Age >65 | 3.82 (1.36–10.69) | 0.011 |
| Stage II or IIIa | 6.36 (2.33–17.34) | <0.01 |
| Two or more unfavorable genotypes | 2.11 (0.96–4.67) | 0.065 |

A Cox multivariate analysis was run twice for each endpoint (TTP and OS), first with each genotype separately and second including the combinations of unfavorable genotypes. The table shows the variables included in the final model. All the factors shown were predictive of decreased TTP and decreased OS.

variants of NAT1 and NAT2 with different acetylation capacity. Multiple association studies have related NAT1 and NAT2 polymorphisms with cancer risk. For example, there is a consistent relation between NAT2 slow acetylators and enhanced susceptibility to bladder cancer [36], and an association between NAT1 polymorphisms and lung cancer [37] has also been described.

An intact DNA repair mechanism reduces the accumulation of genetic aberrations that can contribute to the malignant potential of the tumor and to relapse after treatment. It is known that ERCC1 expression levels can affect the outcome of lung cancer patients, even of those not receiving chemotherapy [38, 39]. A SNP in ERCC1 could modify the expression levels of the gene and thus affect its function. XPC and ERCC1 are involved sequentially in nucleotide excision repair. Whereas XPC is involved in damage recognition, ERCC1 cleaves the damaged DNA and removes the fragment containing the lesion [40]. In the present study, we found nearly significant differences in TTP according to the ERCC1 genotype, and in the multivariate analysis, the influence of ERCC1 rs735482 on OS reached significance. However, since the effect on OS in the univariate analysis was not statistically significant, we speculate that the influence of the ERCC1 SNP on OS is not independent of another variable. Various SNPs have been identified within the gene ERCC1. To date, there has been no report on the influence of ERCC1 rs735482 on lung cancer risk; however, a SNP in exon 4 of ERCC1 has been associated with risk of lung cancer in a Caucasian population, although this

association was not observed in other populations [25, 41]. We also found significant differences according to the XPC genotype; patients harboring non-wt XPC rs2228001 had an earlier relapse, independent of disease stage or PS. However, the molecular mechanism whereby this SNP can affect the gene function is at present unknown.

Interestingly, the present study highlights the cumulative effect of unfavorable genotypes, since harboring at least two unfavorable genotypes was a significant worsening factor for both TTP and OS. Furthermore, the effect on TTP—though not on OS—was independent of disease stage or PS. It is noteworthy that this genetic profile includes genes involved in different pathways, including phase I and phase II metabolism and DNA repair, indicating that genetic variations in more than one pathway may well have a greater effect than when only one pathway is involved.

There is a wealth of knowledge about the relationship between SNPs in DNA repair, drug-metabolizing enzymes, and multidrug resistance genes and the clinical outcome of NSCLC patients treated with chemotherapy [42–44]. However, the population analyzed in this study had not received any systemic treatment that could have modified the outcome.

Given the high rate of relapse in early-stage NSCLC, biomarkers to predict the risk of disease progression are needed, especially in stage I, where adjuvant chemotherapy is not routinely administered but where it may be effective in certain subgroups of patients [45]. The present study included a relatively small number

of patients, making it difficult to draw definite conclusions as to whether or not to offer adjuvant chemotherapy to these patients. However, should these results be confirmed in a larger series, SNPs analyzed in the present study could be a valuable additional tool for individualizing treatment in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

MC is supported by a Premi Fi de Residencia Emili Letang of the Hospital Clínic de Barcelona. BG and TD are FI fellows supported by Agencia de Gestio d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya and Fondo Social Europeo. The authors acknowledge support for this work by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS-PI-060087 and FIS-PI040123) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR-09).

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *Ca Cancer J Clin* 2009;59:225.
- Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small-cell lung cancer: A decade of progress. *Chest* 2002; 122:1037.
- 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.
- PORT Meta-Analysis Trialist Group: Postoperative radiotherapy in non-small cell lung cancer: Systemic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998;352:257.
- Hecht S. Tobacco carcinogens, their biomarkers, and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733.
- Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001;14:611.
- Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1194.
- Sancar A, Lindsey-Boltz La, Unsal-Kaçmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39.
- Bauer E, Guo Z, Ueng YF, et al. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1995;8:136.
- Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases—A review. *Curr Med Chem* 1999;6:279.
- Seidegard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1997;105:791.
- Sim E, Walters K, Boukouvala S. Arylamine N-acetyltransferases: From structure to function. *Drug Metab Rev* 2008;40:479.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, et al. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:3.
- Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: Effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996;15:273.
- Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:27.
- Zienolddiny S, Campa D, Lind H, et al. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small-cell lung cancer in smokers. *Carcinogenesis* 2008;29:1164.
- Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer* 2007;57:1.
- Cote ML, Chen W, Smith DW, et al. Meta- and pooled analysis of GSTP1 polymorphism and lung cancer: A HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2009;169:802.
- Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, et al. EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer. *Epidemiology* 2006;17:89.
- Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: Role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002;65:506.
- Hashibe M, Brennan P, Strange RC, et al. Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1509.
- Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Mutation Res* 2005;577:275.
- Kiyohara C, Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. *Int J Med Sci* 2007;4:59.
- Hung RJ, Brennan P, Canzian F, et al. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:567.
- Zienolddiny S, Campa D, Lind H, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006;27:560.
- Wei Q, Cheng L, Amos CI, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: A molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1764.
- Shen H, Spitz MR, Qiao Y, et al. Smoking, DNA repair capacity and risk of nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003;107:84.
- Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar V. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:610.
- Zhou S. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008; 38:802.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473.
- Lechapt-Zalcman E, Hurbain I, Lacave R, et al. MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur Respir J* 1997;10:1837.
- van der Deen M, Timens W, Timmer-Bosscha H, et al. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed MRP1/Mdr1a/1b deficient mice. *Respir Res* 2007;8:49.
- Wang H, Jin G, Wang H, et al. Genetic susceptibility of lung cancer associated with common variants in the 3' untranslated regions of the adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and ABCC1 candidate transporter genes for carcinogen export. *Cancer* 2009;115:595.
- Grau JJ, Caballero M, Campayo M, et al. Gene single nucleotide polymorphism accumulation improves survival in advanced head and neck cancer patients treated with weekly paclitaxel. *Laryngoscope* 2009;119:1484.
- Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001;11:597.
- Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, et al. The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: A review considering ethnic differences. *Toxicol Lett* 2002;128:229.
- Bouchardy C, Mitrunen K, Wikman H, et al. N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics* 1998;8:291.
- Simon GR, Sharma S, Cantor A, et al. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest* 2005;127:978.

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.
40. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:223.
41. Yin J, Vogel U, Guo L, et al. Lack of association between DNA repair gene ERCC1 polymorphism and risk of lung cancer in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;164:66.
42. Isla D, Sarries C, Rosell R, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:1194.
43. Pan JH, Han JX, Wu JM, et al. CYP450 polymorphisms predict clinic outcomes to vinorelbine-based chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Acta Oncol* 2007;46:361.
44. Virolas N, Provencio M, Reguart N, et al. Single nucleotide polymorphisms in MDR1 gene correlates with outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin plus vinorelbine. *Lung Cancer* 2011;71:191.
45. 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.

IV. SEGON TREBALL

A dual role for KRT81: a miR-SNP associated with recurrence in non-small-cell lung cancer and a novel marker of squamous cell lung carcinoma.

Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Tejero R, Muñoz C, Díaz T, Marrades R, Cabanas ML, Gimferrer JM, Gascon P, Ramirez J, Monzo M.

PLoS One 6(7): e22509

Els miRNAs juguen un paper important en la carcinogènesi a través de la regulació dels seus gens diana. Es tracta de molècules que controlen la diferenciació i el creixement cel·lular i en diferents tipus tumorals s'han associat a l'evolució de la malaltia. La presència de SNPs relacionats amb miRNAs (miR-SNPs) pot alterar la funció i l'expressió d'aquests, afectant la seva biogènesi o els seus llocs diana. D'aquesta manera, polimorfismes en gens relacionats amb miRNAs implicats en càncer o en els propis miRNAs poden jugar un paper en la progressió tumoral. En més detall, polimorfismes en gens de la via de processament dels miRNAs o en la seqüència del pri-miRNA o pre-miRNA poden afectar als nivells finals de determinats miRNAs. A més, polimorfismes en les seqüències d'anclatge de miRNAs poden reprimir la inhibició dels gens diana per aquests i per tant, afectar la seva funció. Per tot això, polimorfismes relacionats amb els miRNAs podrien modificar el risc de recaiguda després de la cirurgia en pacients amb CPCNP.

En aquest treball vam analitzar 11 miR-SNPs en 175 pacients afectes de CPCNP intervingut quirúrgicament i vam avaluar el TR i la SG en funció dels diferents genotips. En concret, els miR-SNPs inclouen 5 SNPs en gens codificants per miRNAs, 3 en llocs d'unió del miRNA al mRNA i 3 en components de la via de processament dels miRNAs.

Primerament vam trobar diferències significatives en el TR segons el genotip de *KRT81* rs3660 (TR mitjà de 20,3 mesos en els pacients amb el genotip CC versus 86,8 mesos en els pacients amb el genotip CG o GG; $P=0,003$) i de *XPO5* rs11077 (TR mitjà de 24,7 mesos en els pacients amb el genotip AA versus 73,1 mesos en els pacients amb els genotips AC o CC; $P=0,029$). A més, quan els pacients eren

analitzats per estadis observàvem que aquestes diferències en TR es mantenien en el subgrup de pacients en estadi I ($P=0,002$ per *KRT81* rs3660; $P<0,001$ per *XPO5* rs11077). Quan analitzàvem els pacients segons la histologia, l'efecte dels genotips de *KRT81* rs3660 en el TR era significatiu en els pacients amb carcinoma escamós ($P=0,004$), però no en els pacients amb adenocarcinoma. En l'anàlisi multivariant, el genotip *KRT81* rs3660 CC (OR=1,8; $P=0,023$) i el genotip *XPO5* rs11077 AA (OR=1,77; $P=0,026$) van resultar ser variables independents de mal pronòstic pel TR.

Adicionalment vam realitzar una anàlisi de l'expressió de *KRT81* per immunohistoquímica que va demostrar la seva expressió en teixit pulmonar i a més, l'anàlisi en 80 mostres va mostrar que el 95% dels carcinomes escamosos eren positius per *KRT81* i en canvi només ho eren el 19% dels adenocarcinomes ($P<0,0001$).

Vam concloure que els miR-SNPs representen una nova classe de SNPs amb un potencial valor pronòstic de l'evolució dels pacients amb CPCNP en estadi precoç ressecat. Aquests SNPs podrien servir com una nova eina per a la selecció dels pacients amb alt risc de recaiguda i particularment els pacients en estadi I, que són els que no reben tractament adjuvant després de la cirurgia. A més, *KRT81* podria representar un nou marcador immunohistoquímic per a la identificació del carcinoma escamós de pulmó.

A Dual Role for KRT81: A miR-SNP Associated with Recurrence in Non-Small-Cell Lung Cancer and a Novel Marker of Squamous Cell Lung Carcinoma

Marc Campayo¹, Alfons Navarro², Nuria Viñolas¹, Rut Tejero², Carmen Muñoz², Tania Diaz², Ramon Marrades³, Maria L. Cabanas⁴, Josep M. Gimferrer⁵, Pere Gascon¹, Jose Ramirez⁴, Mariano Monzo^{2*}

1 Department of Medical Oncology, Institut Clinic Malalties Hemato-Oncològiques (ICMHO), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, 2 Human Anatomy and Embryology Unit, Laboratory of Molecular Oncology and Embryology, School of Medicine, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, 3 Department of Pneumology, Institut Clinic del Tòrax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain, 4 Department of Pathology, Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain, 5 Department of Thoracic Surgery, Institut Clinic del Tòrax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) play an important role in carcinogenesis through the regulation of their target genes. miRNA-related single nucleotide polymorphisms (miR-SNPs) can affect miRNA biogenesis and target sites and can alter microRNA expression and functions. We examined 11 miR-SNPs, including 5 in microRNA genes, 3 in microRNA binding sites and 3 in microRNA-processing machinery components, and evaluated time to recurrence (TTR) according to miR-SNP genotypes in 175 surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. Significant differences in TTR were found according to KRT81 rs3660 (median TTR: 20.3 months for the CC genotype versus 86.8 months for the CG or GG genotype; $P = 0.003$) and XPO5 rs11077 (median TTR: 24.7 months for the AA genotype versus 73.1 months for the AC or CC genotypes; $P = 0.029$). Moreover, when patients were divided according to stage, these differences were maintained for stage I patients ($P = 0.002$ for KRT81 rs3660; $P < 0.001$ for XPO5 rs11077). When patients were divided into sub-groups according to histology, the effect of the KRT81 rs3660 genotype on TTR was significant in patients with squamous cell carcinoma ($P = 0.004$) but not in those with adenocarcinoma. In the multivariate analyses, the KRT81 rs3660 CC genotype ($OR = 1.8$; $P = 0.023$) and the XPO5 rs11077 AA genotype ($OR = 1.77$; $P = 0.026$) emerged as independent variables influencing TTR. Immunohistochemical analyses in 80 lung specimens showed that 95% of squamous cell carcinomas were positive for KRT81, compared to only 19% of adenocarcinomas ($P < 0.0001$). In conclusion, miR-SNPs are a novel class of SNPs that can add useful prognostic information on the clinical outcome of resected NSCLC patients and may be a potential key tool for selecting high-risk stage I patients. Moreover, KRT81 has emerged as a promising immunohistochemical marker for the identification of squamous cell lung carcinoma.

Citation: Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Tejero R, Muñoz C, et al. (2011) A Dual Role for KRT81: A miR-SNP Associated with Recurrence in Non-Small-Cell Lung Cancer and a Novel Marker of Squamous Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 6(7): e22509. doi:10.1371/journal.pone.0022509

Editor: Sumitra Deb, Virginia Commonwealth University, United States of America

Received April 19, 2011; Accepted June 22, 2011; Published July 25, 2011

Copyright: © 2011 Campayo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Hospital Clinic de Barcelona (Premi Fi de Residència Emili Letang) and Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social FIS-PI09/00547. Tania Diaz is an FI fellow supported by AGAUR, Generalitat de Catalunya and Fondo Social Europeo. Rut Tejero is an APIF fellow of the University of Barcelona. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mmonzo@ub.edu

Introduction

Lung cancer is the first cause of cancer death worldwide [1]. About 85% of patients have non-small-cell lung cancer (NSCLC) and less than 30% are diagnosed with early-stage disease. The main treatment for early-stage disease is surgery, but even when a complete surgical resection is possible, 20–75% of NSCLC patients will relapse [2]. Given this high rate of relapse, biomarkers to predict the risk of disease progression are needed, especially in stage I, where adjuvant chemotherapy is not routinely administered but where it may be effective in certain subgroups of patients [3].

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression by binding primarily

to the 3'untranslated region (UTR) of their target mRNA and repressing its translation. Several proteins are active in the biogenesis of miRNAs. Briefly, miRNAs are translated by an RNA polymerase II to long primary transcripts (pri-miRNA) and processed in the nucleus by the RNase III Drosha in pre-miRNAs (70–100 nucleotides); the pre-miRNA is transported to the cytoplasm by the XPO5, where the RNase III Dicer generates a duplex molecule of 21–25 nucleotides in length. Through the association with the complex RNA-induced silencing complex (RISC), one of these 2 chains (the mature miRNA) will guide RISC to the target mRNA [4,5]. miRNAs play important roles in the regulation of such crucial processes as development, cell proliferation, differentiation and apoptosis. Growing evidence shows that miRNAs are aberrantly expressed in human cancers,

including NSCLC [6,7,8,9,10,11,12,13], and they have been linked with the etiology and prognosis of many tumors [14]. Depending on their target genes, miRNAs can act either as oncogenes or tumor suppressor genes [15].

Various mechanisms can explain the deregulation of miRNAs observed in cancer, including genomic changes (deletions, amplifications, translocations), epigenetic changes, mutations/polymorphisms, transcriptional deregulation, and alterations in the miRNA biogenesis machinery [14,16]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that can affect miRNA functions, known as miR-SNPs, are found in miRNA genes, in miRNA binding sites (in 3' UTR of the target gene) or in the components of the miRNA biogenesis machinery [17]. miR-SNPs can affect miRNA expression levels in different ways, resulting in loss or gain of miRNA function [18]. SNPs in miRNA genes can affect the pri-miRNA, pre-miRNA or mature miRNA sequence and can potentially modulate miRNA processing, alter mature miRNA levels or change miRNA-mRNA interactions [19,20]; SNPs affecting the expression of proteins involved in miRNA biogenesis may alter the miRNAome in the cell [21]; and finally, SNPs in miRNA target sites, which are more frequent and more specific in the human genome, can disrupt or alter the miRNA-mediated repression of a target gene [22].

This novel class of SNPs opens up a new area of research in cancer biology and clinical oncology, especially in the study of disease progression, patient prognosis and treatment efficacy. Recently, various studies have shown that SNPs in miRNA networks can affect both the risk of developing various cancers [20] and also the prognosis of many tumors [23,24,25,26].

In the present study, we have evaluated 11 SNPs (five in miRNA genes, three in miRNA binding sites, and three in

miRNA-processing genes) in 175 surgically resected NSCLC patients and correlated our findings with time to recurrence (TTR) and overall survival (OS). In addition, in order to examine potential differences in expression according to histology, we examined the immunostaining pattern of KRT81 in 77 lung cancer specimens and three normal lung controls.

Materials and Methods

Study population and Ethics Statement

Between March 1996 and December 2009, 175 NSCLC patients underwent complete surgical resection in our institution. All patients had pathologically confirmed stage I-III disease. Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.

Selection of the miR-SNPs

We selected 11 SNPs in genes involved in miRNA regulatory pathways: SNPs in miRNA genes; SNPs in miRNA binding sites; and SNPs in miRNA-processing genes. Ten of the SNPs were selected according to the following requirements: firstly, a determined allele frequency for the European population and availability in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP database; secondly, a minor genotype frequency for the European population ≥ 0.05 ; and finally, either a known association with a differential susceptibility to cancer development or a differential expression in solid tumors. For the SNPs in miRNA binding sites, we selected three SNPs with an aberrant allelic frequency in human tumors. In addition, one SNP – in

Table 1. Rationale for the selection of the miR-SNPs analyzed.

| Location | Gene | rs NCBI (AB assay ID) | Rationale * |
|----------------------------|----------|-------------------------------|--|
| miRNA genes | MIR194-2 | rs11231898 (C_32062040_10) | miR-194 is differentially expressed in lung cancer [11] * |
| | MIR196A2 | rs11614913 (C_31185852_10) | Risk of head and neck, breast, lung and gastric cancers [25,27,44,45] Poor survival in lung cancer [23] |
| | MIR149 | rs2292832 (C_11533078_1) | miR-149 is differentially expressed in prostate cancer [46] |
| | MIR423 | rs6505162 (C_11613678_10) | Risk of bladder cancer [47] Decreased risk esophageal cancer [48] |
| | MIR146A | rs2910164 (C_15946974_10) | Risk of papillary thyroid carcinoma [49] Risk of hepatocarcinoma [50] Risk of prostate cancer [51] |
| miRNA binding sites | KRT81 | rs3660 (C_11917951_20) | miRNA-binding SNPs with an aberrant SNP allele frequency in human cancers [36] |
| | FAM179B | rs1053667 (C_11606996_1) | miRNA-binding SNPs with an aberrant SNP allele frequency in human cancers [36] |
| | AFF1 | rs17703261 (C_32818766_10) | miRNA-binding SNPs with an aberrant SNP allele frequency in human cancers [36] |
| miRNA-processing machinery | XPO5 | rs11077 (C_3109165_1) | Risk of esophageal cancer [48] |
| | RAN | rs14035 (C_11351340_10) | Risk of esophageal cancer [48] |
| | TRBP | rs784567 (C_9576934_20) | Risk of bladder cancer [47] |

*One of the selection criteria was a described association with a differential susceptibility to cancer development. In MIR194-2, the association was with the miRNA containing the SNP, while in all other cases, the association was with the miR-SNP itself.

doi:10.1371/journal.pone.0022509.t001

MIR194-2 – was specifically chosen because it had been shown to be differentially expressed in lung cancer [11]. Table 1 summarizes the rationale for the SNP selection.

DNA isolation, primers, probes and SNP analysis

DNA was obtained from paraffin-embedded tumor tissue using the commercial DNeasy tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's protocol. To measure DNA quantity, a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) was used. Primers and probes were commercially available (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Foster City, CA). SNP analysis was performed by allelic discrimination in an ABI PRISM 7500 Sequence detection system (Applied Biosystems).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of 77 lung carcinomas and 3 normal lung controls from the Pathology Service of the Hospital Clinic of Barcelona after review by a thoracic pathologist. Five- μ m-thick transverse sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were serially cut and mounted on to Dako Silanized Slides (S-3003; Dako, Glostrup, Denmark). For antigen retrieval, the sections were manually immersed in Target Retrieval solution,

high pH (Dako) and heated in a water bath at 95–99°C for 20 min. Endogenous peroxidase activity was quenched by immersion in Dako Real Peroxidase-Blocking solution for 10 min. The tissue sections were incubated with primary antibody against KRT81 (dilution 1:50; clone sc-100929; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 30 min at room temperature. Immunoperoxidase staining was performed using Advance system/HRP (Dako) and Liquid DAB+ (Dako). Finally, sections were stained with hematoxylin. All slides were blindly scored by the same two pathologists using a 3-point system. The scoring system was as follows: 0, <5% of tumor cells staining; 1, 5% to 50% of tumor cells staining; 2, >50% of tumor cells staining.

Table 2. Patient characteristics.

| Characteristic | Value | N = 175 N (%) | TTR P-value | OS P-value |
|--------------------|-------------------------|------------------|----------------|---------------|
| Sex | Male | 154 (88) | 0.081 | 0.173 |
| | Female | 21 (12) | | |
| Age | <65 | 84 (48) | 0.926 | 0.014 |
| | >65 | 91 (52) | | |
| Performance Status | 0 | 24 (13.7) | 0.989 | 0.360 |
| | 1 | 149 (85.2) | | |
| | 2 | 2 (1.1) | | |
| | | | | |
| Stage | I | 98 (56) | 0.008 | 0.349 |
| | II | 40 (22.9) | | |
| | III | 37 (21.1) | | |
| Histology | Adenocarcinoma | 80 (45.7) | 0.996 | 0.756 |
| | Squamous cell carcinoma | 84 (48) | | |
| | Others | 11 (6.3) | | |
| Smoking History | Current smoker | 72 (41.1) | 0.648 | 0.828 |
| | Former smoker | 86 (49.2) | | |
| | Never smoker | 9 (5.1) | | |
| | Unknown | 8 (4.6) | | |
| Type of surgery | Lobectomy/Bilobectomy | 132 (75.4) | 0.116 | 0.307 |
| | Pneumonectomy | 34 (19.4) | | |
| | Atypical resection | 9 (5.2) | | |
| Treatment | Neoadjuvant* | 9 (5.1) | 0.492 | 0.339 |
| | Adjuvant** | 16 (9.1%) | | |
| Recurrence | No | 100 (57.1) | | |
| | Yes | 75 (42.9) | | |

*chemotherapy or chemoradiotherapy; **chemotherapy.
doi:10.1371/journal.pone.0022509.t002

Table 3. Genotypic frequencies in the present study and for the European Population in NCBI dbSNP.

| Gene | Genotype | EP | N (%) | TTR P-value | OS P-value |
|------------------------|----------|------|------------|-------------|------------|
| MIR194-2 | GG | 100 | 161 (100) | | |
| rs11231898 n = 161* | AG | - | - | - | - |
| | AA | - | - | | |
| MIR196A2 | CC | 31 | 66(38.1) | | |
| rs11614913 n = 173 | CT | 50 | 87(50.3) | 0.798 | 0.227 |
| | TT | 19 | 20(11.6) | | |
| MIR149 | CC | 56.7 | 93 (56) | | |
| rs2292832 n = 166 | CT | 35 | 50 (30.1) | 0.502 | 0.845 |
| | TT | 8.3 | 23 (13.9) | | |
| MIR423 | AA | 26.7 | 49 (28.8) | | |
| rs6505162 n = 170 | AC | 61.7 | 79 (46.5) | 0.754 | 0.043 |
| | CC | 11.7 | 42 (24.7) | | |
| MIR146A | GG | 59.3 | 92 (52.9) | | |
| rs2910164 n = 174 | CG | 33.9 | 75 (43.1) | 0.845 | 0.815 |
| | CC | 6.8 | 7 (4) | | |
| KRT81 | CC | 36.7 | 45 (25.9) | | |
| rs3660 n = 174 | CG | 45 | 79 (45.4) | 0.008 | 0.471 |
| | GG | 18.3 | 50 (28.7) | | |
| FAM179B | TT | 93.3 | 158 (90.8) | | |
| rs1053667 n = 174 | CT | 5 | 16 (9.2) | 0.977 | 0.407 |
| | CC | 1.7 | - | | |
| AFF1 | AA | 59.1 | - | | |
| rs17703261 n = 133* | AT | 22.7 | 133 (100) | - | - |
| | TT | 18.2 | - | | |
| XPO5 | AA | 41.7 | 58 (34.7) | | |
| rs11077 n = 167 | AC | 36.7 | 74 (44.3) | 0.077 | 0.363 |
| | CC | 21.7 | 35 (21) | | |
| RAN | CC | 55 | 72 (49.3) | | |
| rs14035 n = 146 | CT | 36.7 | 65 (44.5) | 0.263 | 0.202 |
| | TT | 8.3 | 9 (6.2) | | |
| TRBP | CC | 28.3 | 45 (26.2) | | |
| rs784567 n = 172 | CT | 46.7 | 91 (52.9) | 0.985 | 0.636 |
| | TT | 25 | 36 (20.9) | | |

EP: frequencies (%) for European Population in NCBI dbSNP.

In some cases the genotype could not be determined; "n" indicates the number of patients genotyped in each case.

*In these two cases we discontinued the analysis since all patients analyzed had the same genotype.

doi:10.1371/journal.pone.0022509.t003

Uninterpretable results were eliminated from further consideration. Cases scored 1 or 2 were considered positive, and cases scored 0 were considered negative. Only cytoplasmic positivity was evaluated. Tissue sections from normal lung were used as positive controls while negative controls were obtained by incubating the sections without the primary antibody.

Statistical analysis

The primary objective of the study was TTR. The secondary objective was OS. All statistical analyses were performed using PAS W Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). TTR was calculated from the time of surgical treatment to the date of relapse or last follow-up. OS was calculated from the time of surgical treatment to the date of death or last follow-up. After surgery, patients without tumor progression were followed every 3 months for 2 years, then every 6 months until 5 years after surgery, and then annually. The log-rank test and Kaplan-Meier plots were used to evaluate the association of TTR and OS with each of the SNPs and clinical variables. A Cox multivariate analysis (enter method) was used to calculate the independent odds ratios for TTR and OS. In the immunohistochemical analyses, frequencies were compared by the Fisher's exact test. The level of significance was set at #0.05.

Results

Patient Characteristics

The analysis included 175 patients, 154 (88%) of whom were male. Median age was 65 years (range, 35–85). Twenty-four (13.7%) patients had Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) 0 and 149 (85.2%) patients had PS 1. Ninety-eight (56%) patients had stage I disease. Eighty (45.7%) patients had adenocarcinoma and 84 (48%) had squamous cell carcinoma. One hundred and fifty-eight (90.3%) patients were active or former smokers. One hundred and thirty-two (75.4%) patients underwent a lobectomy or bilobectomy. Nine (5.1%) patients had received preoperative chemotherapy or

chemoradiotherapy for resectable stage IIIA disease. Sixteen patients (9.1%) received adjuvant chemotherapy (13 for stage II or III disease and 3 for stage I disease with T>4 cm). Mean follow-up was 35 months (range, 2–160). After a follow-up of 160 months, disease recurrence had occurred in 75 (42.9%) patients (Table 2).

TTR, OS and miR-SNPs

Overall median TTR was 39.03 months (95% CI, 3.9–74.1), and median OS was 90.6 months (95% CI, 47.4–133.7). In univariate analyses including only clinical characteristics, stage was associated with TTR ($P = 0.008$) and age was associated with OS ($P = 0.014$). A non-significant trend towards an association between sex and TTR was also observed ($P = 0.081$). Table 3 shows the genotypic frequencies for all 11 miR-SNPs analyzed, both in the present study and as reported in NCBI SNP database (dbSNP) for the European population. Significant differences in TTR were found according to KRT81 rs3660 genotype ($P = 0.008$; Figure S1). Given the similar distribution in TTR for patients with the CG and GG genotypes, these two groups were combined for further analyses. Median TTR for 45 patients (25.9%) with the CC genotype was 20.3 months versus 86.8 months for patients with the CG or GG genotype ($P = 0.003$; Figure 1A). Among 98 patients with stage I disease, median TTR was 23.9 months for 25 patients (25.5%) with the CC genotype versus 100.2 months for patients with the CG or GG genotype ($P = 0.002$; Figure 1B). We also observed a non-significant trend towards a differential TTR according to the XPO5 rs11077 genotype ($P = 0.077$; Figure S2). Given the similar distribution in TTR for patients with the AC and CC genotypes, these two groups were combined for further analyses. A significantly shorter TTR was observed in patients with the XPO5 rs11077 AA genotype; median TTR was 24.7 months for patients with the AA genotype, versus 73.1 months for those with the AC or CC genotype ($P = 0.029$; Figure 2A). Among 97 patients with stage I disease, median TTR was 24.13 months for 33 patients (34%) with the AA genotype but was not reached for those with the AC or CC genotype ($P < 0.001$; Figure 2B). No other differences in TTR were observed according to any of the

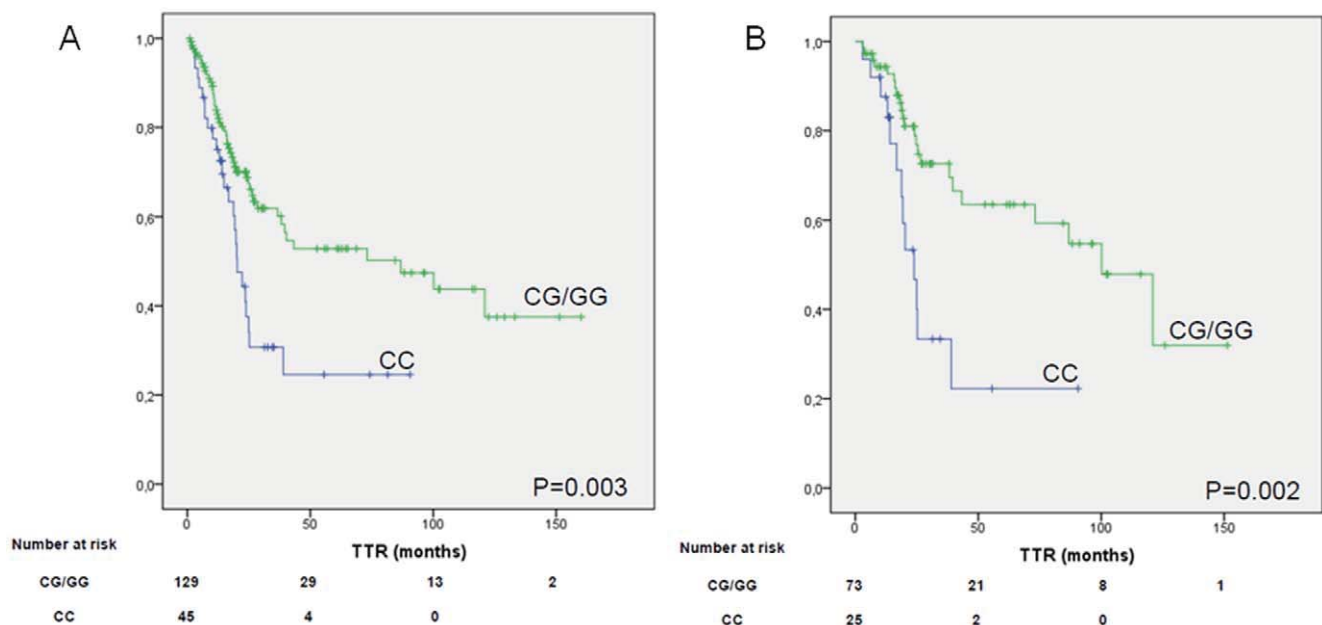


Figure 1. TTR according to KRT81 rs3660 genotype (CC = wild-type; CG/GG = non wild-type). 1A: in all patients analyzed. 1B: patients with stage I disease.

doi:10.1371/journal.pone.0022509.g001

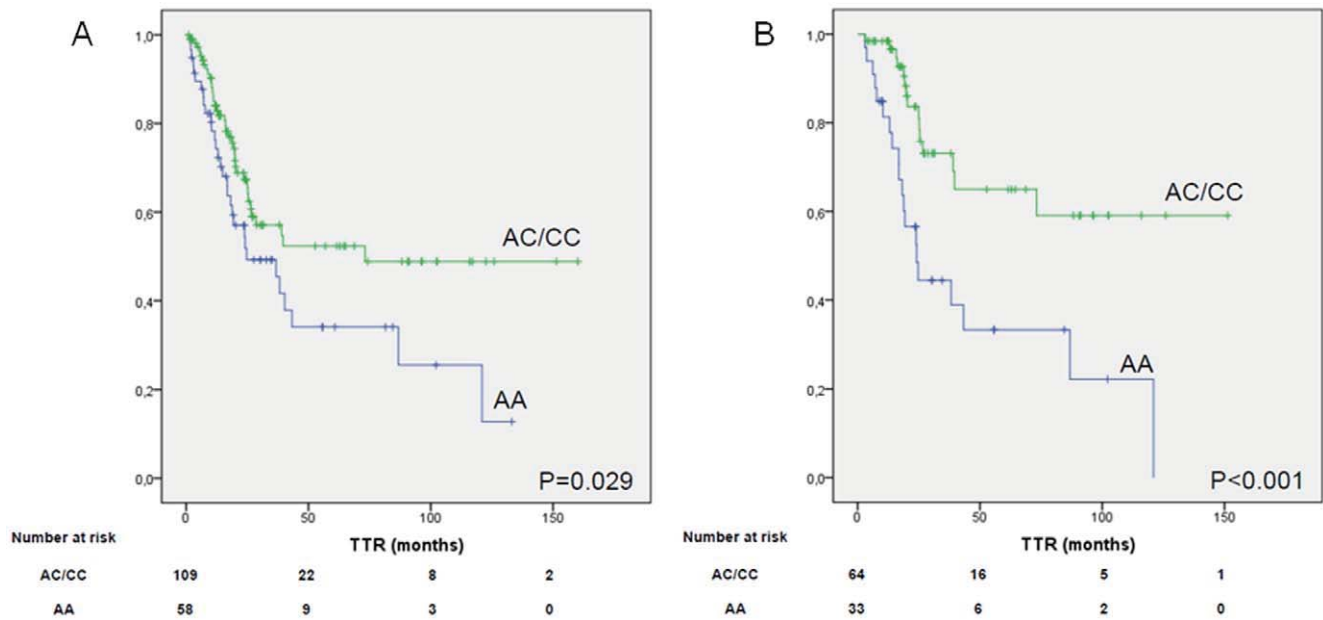


Figure 2. TTR according to XPO5 rs11077 genotype (AA = wild-type; AC/CC = non wild-type). 1A: in all patients analyzed. 1B: in patients with stage I disease.

doi:10.1371/journal.pone.0022509.g002

other genotypes analyzed. No significant differences in TTR were observed in stage II-III patients according to any of the SNPs analyzed.

Median OS was not reached for 49 patients with the MIR423 rs6505162 AA genotype, compared to 61.6 months for 42 patients with the CC genotype and 90.5 months for those with the AC genotype ($P = 0.043$; Figure S3). No other differences in OS were observed according to any of the other genotypes analyzed.

Multivariate analyses

All variables with a univariate TTR log-rank $P \leq 0.1$ (sex, stage, type of surgery, KRT81 rs3660 genotype and XPO5 rs11077 genotype) were included in the Cox multivariate analysis for TTR. Male sex (odds ratio [OR], 3.73; 95% CI, 1.4–9.9; $P = 0.008$), stage I disease (OR, 0.34; 95% CI, 0.18–0.65; $P = 0.001$), KRT81 rs3660 CC genotype (OR, 1.8; 95% CI, 1.08–2.99; $P = 0.023$) and XPO5 rs11077 AA genotype (OR, 1.77; 95% CI, 1.07–2.91; $P = 0.026$) emerged as independent variables for TTR (Table 4). All variables with a univariate OS log-rank $P \leq 0.1$ (sex, age and MIR423 rs6505162 genotype) and disease stage were included in the Cox multivariate analysis for OS. Age ≤ 65 (OR, 0.48; 95% CI, 0.25–0.95; $P = 0.036$) and stage I disease (OR = 0.31, 95% CI 0.14–0.67; $P = 0.003$) were independent variables for OS.

Further analyses of KRT81

Since significant differences in TTR were found according to KRT81 rs3660 genotype, we further examined the effect of this genotype on the sub-groups of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Among the 83 patients with squamous cell carcinoma, TTR was 19.3 months for 24 patients with the CC genotype and 121 months for 59 patients with the CG or GG genotype ($P = 0.004$; Figure 3A). In contrast, no significant difference was observed according to the KRT81 rs3660 genotype among the 80 patients with adenocarcinoma ($P = 0.375$; Figure 3B). We then explored the possibility of a similar differential effect for the other ten genotypes but found no

differences in TTR between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma according to genotype.

In order to further explore this marked prognostic value of the KRT81 rs3660 genotype in squamous cell carcinoma, we analyzed KRT81 expression by immunohistochemistry in 42 squamous cell carcinoma, 33 adenocarcinoma and 2 adenosquamous carcinoma samples and in three normal lung tissue samples. Table S1 shows the results of each of the 80 samples. Notable differences were observed in the immunostaining pattern according to histological sub-type: 38 of 40 squamous cell carcinomas (95%) were positive, compared to 6 of 32 adenocarcinomas (19%) (Fisher's exact test $P < 0.0001$; Table 5). Moreover, 3 of the 6 positive adenocarcinomas showed only a focal positivity (score 1). Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy were 0.95, 0.81, 0.86, 0.93 and 0.89, respectively. Figure 3C-F shows examples of the immunohistochemical evaluation in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and controls.

Discussion

In the present study, we have analyzed 11 miR-SNPs in a series of 175 resected NSCLC patients and correlated our results with TTR and OS. We found that patients with the KRT81 rs3660 CC genotype had a shorter TTR than those with the CG or GG genotype and that patients with the XPO5 rs11077 AA genotype

Table 4. Multivariate analysis for TTR.

| Variable | OR (95% CI) | P-value |
|-----------------|------------------|---------|
| Male sex | 3.73 (1.4–9.9) | 0.008 |
| Stage I | 0.34 (0.18–0.65) | 0.001 |
| KRT81 rs3660 CC | 1.8 (1.08–2.99) | 0.023 |
| XPO5 rs11077 AA | 1.77 (1.07–2.91) | 0.026 |

doi:10.1371/journal.pone.0022509.t004

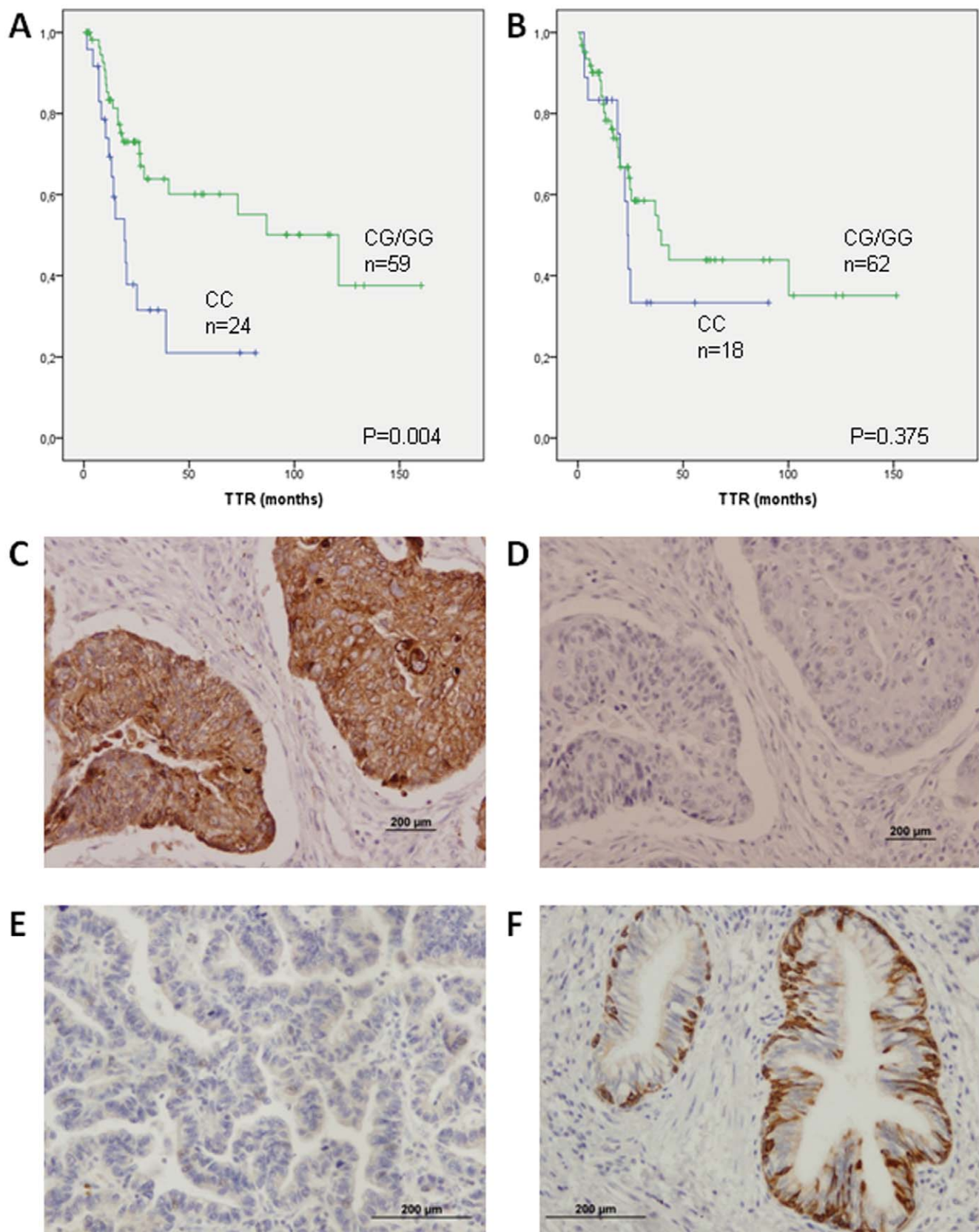


Figure 3. TTR according to KRT81 rs3660 genotype in the main histological subgroups and Immunohistochemistry analysis of KRT81 protein. **A:** TTR according to KRT81 rs3660 genotype in 83 of 84 squamous cell carcinoma patients; one patient could not be genotyped. **B:** TTR according to KRT81 rs3660 genotype in 80 adenocarcinoma patients. **C:** Squamous cell carcinoma case showing diffuse cytoplasmic KRT81

staining. D: Negative control. E: Negative staining for KRT81 in an adenocarcinoma case. F: Immunohistochemistry in a normal lung tissue section. KRT81 cytoplasmic positivity in the bronchiolar epithelium was used as positive control. doi:10.1371/journal.pone.0022509.g003

had a shorter TTR than those with the AC or CC genotype. These results also held true in the subgroup of patients with stage I disease. Furthermore, the multivariate analyses showed that the KRT81 rs3660 CC genotype and the XPO5 rs11077 AA genotype were independent prognostic variables for TTR. The univariate analysis for OS showed an association between survival and the MIR423 rs6505162 genotype; however, this was not an independent variable in the multivariate analysis. Furthermore, the prognostic value of the KRT81 rs3660 genotype was more marked in squamous cell carcinoma, indicating that KRT81 may be a novel immunohistochemical marker for squamous cell carcinoma of the lung.

Several miR-SNPs are known to affect lung cancer susceptibility and survival. A SNP in the pre-miR-196a2 rs11614913 was first associated with survival in NSCLC patients [23] and was later linked to a higher risk of developing lung cancer in Chinese [27] and Korean [28] populations. A SNP in the pre-miRNA flanking region miR-30c-1 rs928508 has been related to survival in NSCLC, with a greater effect in stage I and II disease [29]. A miRNA target site SNP in the KRAS gene was associated with a higher risk of developing NSCLC among moderate smokers [22]. Recently, a SNP haplotype in the miRNA biogenesis gene RNASEN was associated with shorter survival in lung cancer [30], and a SNP in another biogenesis-related compound, AGO1 rs636832, was linked to a decreased risk of lung cancer [31]. To date, however, no relation between miR-SNPs and lung cancer recurrence after surgery has been reported.

XPO5 is the RAN-GTP-dependent protein that transports the pre-miRNA from the nucleus to the cytoplasm. Recently, no relation was found between XPO5 rs11077 and lung cancer risk in a Korean population [31]. In contrast, in the present study, we have observed a positive association between this SNP and TTR in a European population. We speculate that a SNP in XPO5 could alter the normal function of the protein to extrude the pre-miRNAs from the nucleus, thus altering the regulation of multiple miRNAs in the cell.

Stage II and III NSCLC patients are routinely treated with adjuvant chemotherapy after surgical resection, which has improved survival in several randomized clinical trials [3,32,33,34]. However, there are many high-risk stage I patients that could also benefit from this treatment, and it has been suggested that patients with tumors ≥ 4 cm can derive survival benefit from adjuvant chemotherapy [35]. Biomarkers to accurately identify stage I patients with a high risk of recurrence would be a useful tool in the management of these patients. Since the

effect on recurrence observed with the genetic variants in KRT81 and XPO5 was maintained in the subgroup of patients with stage I disease, we suggest that these SNPs are ideal candidates for further investigation with a view to individualizing treatment in these patients.

Importantly, tumor recurrence was influenced by the SNP located in the 3'UTR of KRT81, the binding site of several miRNAs: miR-17, miR-93, miR-20b, miR-519d, miR-520g, miR-520h, miR-519c-3p, miR-519b-3p, miR-519a and miR-765. Some of these miRNAs have previously been shown to be altered in NSCLC [11], and the presence of the SNP affects the seed-sequence binding site of these miRNAs, as shown in Figure S4. The allelic frequency of this SNP is different in human cancers than in the normal population [36]. KRT81 encodes for KRT81 protein, also known as Hb-1, a type of hair keratin that is physiologically expressed in hair shafts. Keratins are proteins expressed in all types of epithelial cells [37], with different expression patterns among different carcinomas [38], and they are extensively used as diagnostic markers. They constitute the intermediate filaments of epithelial cells, involved in the maintenance of cell integrity and resistance to mechanical and non-mechanical stressors [39]. Keratins are not only related to the regulation of cellular functions like motility and growth but also to protein synthesis, apico-basal polarization and intracellular signaling, and they have been described as prognostic markers in epithelial tumors [40]. Breast carcinomas ectopically express KRT81 [41], and in the present study we have observed KRT81 expression in lung tumor tissue by immunohistochemistry. To date, KRT81 has not been validated as a prognostic marker, and the present study is the first to link a KRT81 variant to tumor recurrence.

In addition, we have found that KRT81 may well be a new immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma. KRT81 showed a clear positive staining in squamous cell carcinomas (95% positive), whereas 81% of adenocarcinomas were negative. Interestingly, in the sub-group analyses of TTR according to histological sub-type, the effect of the KRT81 rs3660 genotype on recurrence was more pronounced in patients with squamous cell carcinoma. The fact that several new targeted agents are activespecifically in adenocarcinoma and others should not be used in squamous cell carcinoma because of potential complications underscores the need to further classify NSCLC as squamous or non-squamous carcinoma. In this setting, KRT81 could be a useful novel marker for the differential diagnosis of NSCLC; as such, it could be added to the panel of immunohistochemical markers currently used, such as TTF1 and P63 [42,43].

The growing evidence of links between miRNAs and cancer makes the analysis of SNPs in miRNA-related genes a potential key technique for selecting patients for risk stratification. Despite certain limitations – including the lack of independent or functional validation and the relatively limited number of SNPs – the present study is the first to observe miR-SNP-related differential patterns of tumor recurrence in surgically treated NSCLC patients. Our findings indicate that SNPs in KRT81 and XPO5 could prove to be useful biomarkers for individualizing therapy in NSCLC patients and that KRT81 may be a novel immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma, providing a new diagnostic tool to be used in therapeutic decision-making.

Table 5. Immunostaining of KRT81 in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas.

| | SCC (n = 40*) | ADC (n = 32*) |
|---------------------|------------------|------------------|
| Negative (0) | 2 (5%) | 26 (81%) |
| Positive (1+2) | 38 (95%) | 6 (19%) |
| Fisher's exact test | P = 0.0001 | |

SCC: squamous cell carcinoma; ADC: adenocarcinoma.

*Immunostaining was not interpretable in 2 SCC and 1

ADC. doi:10.1371/journal.pone.0022509.t005

Supporting Information

Figure S1 TTR according to KRT81 rs3660 genotype. (TIF)

Figure S2 TTR according to XPO5 rs11077 genotype. (TIF)

Figure S3 OS according to MIR423 rs6505162 genotype. (TIF)

Figure S4 Predicted conserved miRNAs targeting KRT81. SNP rs3660, located in the 3'UTR region of KRT81, affects the binding of these miRNAs. (PPTX)

References

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277–300.
- Brundage MD (2002) Prognostic Factors in Non-small Cell Lung Cancer* : A Decade of Progress. *Chest* 122: 1037–1057.
- Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, et al. (2004) Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 350: 351–360.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281–297.
- Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 199–227.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, et al. (2004) Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res* 64: 3753–3756.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189–198.
- Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, et al. (2009) miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30: 1903–1909.
- Raponi M, Dossey L, Jatko T, Wu X, Chen G, et al. (2009) MicroRNA Classifiers for Predicting Prognosis of Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 69: 5776–5783.
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, et al. (2010) Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 28: 1721–1726.
- Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S (2010) Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection. *Cancer Res* 70:36–45.
- Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, et al. (2010) MicroRNA Expression Differentiates Histology and Predicts Survival of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 16: 430–441.
- Duncavage E, Goodgame B, Sezhiyan A, Govindan R, Pfeifer J (2010) Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5: 1755–1763.
- Iorio MV, Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J Clin Oncol* 27: 5848–5856.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259–269.
- Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 7: 2643–2646.
- Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR (2008) MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* 7: 853–858.
- Mishra PJ, Humeniuk R, Longo-Sorbello GSA, Banerjee D, Bertino JR (2007) A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13513–13518.
- Wu M, Jolicoeur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, et al. (2008) Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis* 29: 1710–1716.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC (2010) Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 10: 389–402.
- Mishra PJ, Bertino JR (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 10: 399–416.
- Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, et al. (2008) A SNP in a let-7 microRNA Complementary Site in the KRAS 3' Untranslated Region Increases Non-Small Cell Lung Cancer Risk. *Cancer Res* 68: 8535–8540.
- Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, et al. (2008) Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 118:2600–2608.
- Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, et al. (2009) A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 30: 1003–1007.
- Christensen BC, Avissar-Whiting M, Ouellet LG, Butler RA, Nelson HH, et al. (2010) Mature MicroRNA Sequence Polymorphism in MIR196A2 Is Associated with Risk and Prognosis of Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* 16:3713–3720.
- Lin J, Horikawa Y, Tamboli P, Clague J, Wood CG, et al. (2010) Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31: 1805–1812.
- Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, et al. (2009) A Functional Genetic Variant in microRNA-196a2 Is Associated with Increased Susceptibility of Lung Cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1183–1187.
- Kim MJ, Yoo SS, Choi Y-Y, Park JY (2010) A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer* 69: 127–129.
- Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, et al. (2011) Genetic Polymorphisms in the Precursor MicroRNA Flanking Region and Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 641–648.
- Rotunno M, Zhao Y, Bergen AW, Koshiol J, Burdette L, et al. (2010) Inherited polymorphisms in the RNA-mediated interference machinery affect microRNA expression and lung cancer survival. *Br J Cancer* 103: 1870–1874.
- Kim J-S, Choi YY, Jin G, Kang H-G, Choi J-E, et al. (2010) Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: A two-stage case-control study. *Mol Carcinog* 49: 913–921.
- Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, et al. (2004) A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 350: 1713–1721.
- Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, et al. (2005) Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 352: 2589–2597.
- Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, et al. (2006) 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* 7: 719–727.
- Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, et al. (2008) Adjuvant Paclitaxel Plus Carboplatin Compared With Observation in Stage IB Non-Small-Cell Lung Cancer: CALGB 9633 With the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol* 26: 5043–5051.
- Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin Y, et al. (2007) Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res* 35: 4535–4541.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11–24.
- Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129: 705–733.
- Coulombe PA, Omary MB (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 14: 110–122.
- Karantza V (2010) Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30: 127–138.
- Regnier CH, Boulay A, Asch PH, Wendling C, Chenard MP, et al. (1998) Expression of a truncated form of hHb1 hair keratin in human breast carcinomas. *Br J Cancer* 78: 1640–1644.
- Kargi A, Gurel D, Tuna B (2007) The diagnostic value of TTF-1, CK 5/6, and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohisto-chem Mol Morphol* 15: 415–420.
- Ring BZ, Seitz RS, Beck RA, Shasteen WJ, Soltermann A, et al. (2009) A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Modern Pathology* 22: 1032–1043.

Table S1 Immunostaining of KRT81 in the 80 cases analyzed. (DOC)

Acknowledgments

We thank Dolores Fuster (University of Barcelona) for technical help and to Renee O'Brate for her assistance in writing the paper.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AN MC MM. Performed the experiments: MC RT CM TD. Analyzed the data: MC AN NV MM JR. Contributed reagents/materials/analysis tools: RM MLC JMG. Wrote the paper: MC AN NV PG MM.

44. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, et al. (2009) microRNA miR-196a-2 and Breast Cancer: A Genetic and Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Res* 69: 5970–5977.
45. Peng S, Kuang Z, Sheng C, Zhang Y, Xu H, et al. (2009) Association of MicroRNA-196a-2 Gene Polymorphism with Gastric Cancer Risk in a Chinese Population. *Dig Dis Sci* 55: 2288–2293.
46. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf H-J, Wagner I, Stephan C, et al. (2009) Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1166–1176.
47. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, et al. (2008) Evaluation of Genetic Variants in MicroRNA-Related Genes and Risk of Bladder Cancer. *Cancer Res* 68: 2530–2537.
48. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, et al. (2008) Genetic Variations in MicroRNA-Related Genes Are Novel Susceptibility Loci for Esophageal Cancer Risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 1: 460–469.
49. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, et al. (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7269–7274.
50. Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, et al. (2008) A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 29: 2126–2131.
51. Xu B, Feng N-H, Li P-C, Tao J, Wu D, et al. (2010) A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 70: 467–472.

V. DISCUSSIÓ

La susceptibilitat al càncer es deu a interaccions entre factors genètics heretats i l'exposició a factors ambientals. Els SNPs són responsables de diferències genètiques hereditàries entre individus, que no es modifiquen durant la vida d'aquests. En la present tesi, analitzem com intervé el *background* genètic mitjançant l'anàlisi de SNPs, per una banda en gens relacionats en el procés de carcinogènesi mediat pel tabac i per altra banda en gens relacionats amb el funcionament dels miRNAs, en la recaiguda de pacients amb CPCNP en estadi localitzat tractats quirúrgicament.

Primerament vam seleccionar 13 SNPs localitzats en 10 gens involucrats en el metabolisme del tabac (gens de metabolització de fase I i II) i en l'expulsió de carcinògens regulada per proteïnes de membrana amb funció de bomba extractora (família *MDR1/ABCB1*) o en gens involucrats en la reparació de les lesions produïdes en el DNA pels carcinògens actius del tabac, que finalment arriben al nucli de la cèl·lula. Vam incloure 71 pacients fumadors o ex-fumadors que havien realitzat un tractament quirúrgic amb resecció completa. En l'anàlisi univariant, els pacients amb els genotips *CYP2C8* rs10509681 WT i *XPC* rs2228001 WT van tenir un TR més llarg que els pacients no WT. En canvi, els pacients amb el genotip *NAT2* rs1799930 no WT van tenir un TR més prolongat que els pacients WT. A més, vam observar que els pacients que eren portadors d'almenys 2 genotips desfavorables tenien un TR i una SG més curta que els pacients que només tenien un o cap genotip desfavorable. En l'estudi multivariant, els genotips *XPC* rs2228001 no WT i la presència d'almenys 2 genotips desfavorables tenien un efecte advers independent pel TR.

Tal i com ha estat comentat a la introducció, els carcinògens presents en el fum del tabac són convertits cap a uns metabòlits reactius que poden interaccionar amb el DNA i danyar-lo. SNPs presents en gens relacionats amb aquestes vies de metabolització podrien afectar l'activitat de l'enzim codificat i modificar d'aquesta manera els nivells de les molècules reactives produïdes. El SNP en *CYP2C8* rs10509681 s'ha mostrat com un factor de risc per una recaiguda més curta en la nostra sèrie. Varis SNPs han estat descrits en el gen *CYP2C8*. En concret, *CYP2C8* rs10509681 es localitza a l'exó 9 del gen i ha estat relacionat amb un metabolisme disminuït del fàrmac citotòxic paclitaxel, encara que no es coneix una relació amb el risc de desenvolupar CPCNP. Els pacients amb el genotip *NAT2* rs1799930 WT van tenir una recaiguda més precoç que aquells amb el SNP. Aquest SNP es localitza a

l'exó 2 del gen *NAT2*. Les acetiltransferases són uns enzims polimòrfics codificats pels gens *NAT1* i *NAT2*, que estan relacionats amb el metabolisme de les amines aromàtiques. Existeixen diferents variants al·lèliques dels gens amb una diferent capacitat d'acetilació de l'enzim respectiu. Varis estudis han mostrat una associació entre variants polimòrfiques de *NAT1* i *NAT2* i un risc augmentat de desenvolupar càncer. Existeix una relació entre SNPs a *NAT1* i risc de càncer de pulmó (237) i entre acetil·ladors lents de *NAT2* i risc de càncer de bufeta urinària (238), dos càncers amb un factor etiològic comú com és el tabac.

Per altra banda, els diferents sistemes de reparació del DNA s'encarreguen de reduir l'acumulació d'aberracions genètiques que podrien contribuir al potencial maligne del tumor i a la seva recaiguda després del tractament. Es coneix que els nivells d'expressió de *ERCC1* poden afectar l'evolució dels pacients amb CPCNP. Mentre que els pacients amb tumors *ERCC1* positius es beneficien menys del tractament adjuvant amb cisplatí, els pacients amb tumors *ERCC1* negatius tenen una pitjor supervivència quan no es fa quimioteràpia adjuvant si comparem amb els pacients *ERCC1* positius (86, 87). Un SNP en el gen *ERCC1* podria alterar la seva expressió i per tant podria alterar la seva funció. Els gens *XPC* i *ERCC1* estan involucrats de manera seqüencial en el procés de NER, de manera que mentre *XPC* està relacionat en el reconeixement del dany en el DNA, *ERCC1* és el que s'encarrega d'escindir el fragment que conté la lesió (135). En el nostre treball vam trobar una tendència a la significació estadística entre el genotip de *ERCC1* rs735482 i un diferent TR ($P=0.089$). En l'anàlisi multivariant, la influència de *ERCC1* rs735482 en la SG va assolir la significació estadística. No obstant, ja que l'efecte d'aquest SNP en la SG no tenia significació estadística en l'estudi univariant, vam especular que l'efecte en la SG no era independent d'una altra variable i per tant no tenia valor. Varis SNPs han estat identificats en el gen *ERCC1*. No ha estat descrita una associació entre el genotip de *ERCC1* rs735482 i el risc de CPCNP, no obstant, un SNP a l'exó 4 de *ERCC1* s'ha associat a un risc de CPCNP en població caucàsica, encara que aquesta associació no s'ha observat en altres poblacions (142, 239). Addicionalment, també vam trobar diferències segons el genotip *XPC* rs2228001 i l'efecte del genotip no wt en un pitjor TR va resultar independent de l'estadi o de l'ECOG PS en l'anàlisi multivariant. No obstant, el mecanisme molecular pel que aquest SNP podria afectar la funció del gen no es coneix.

De manera interessant, el primer estudi ressalta l'efecte acumulatiu de diferents genotips desfavorables, ja que el ser portador d'almenys 2 genotips no favorables va

resultar ser un factor advers significatiu tant per TR com per SG. A més, la significació mantinguda en l'anàlisi multivariant ens indica que l'efecte en el TR és independent d'altres factors pronòstics. Vull destacar que el perfil de SNPs seleccionats conté gens involucrats en diferents vies, com el metabolisme de fase 1 o 2 i la reparació del DNA. Això podria indicar que variacions genètiques en més d'una via podrien tenir uns efectes més grans que quan només s'afecta una sola via.

Existeixen molts estudis sobre la relació entre SNPs en gens de reparació del DNA, de metabolització de fàrmacs i en *ABCB1/MDR1* i l'evolució clínica de pacients afectes de CPCNP tractats amb quimioteràpia (240-242). No obstant, la població inclosa en el primer treball no havia rebut cap tractament sistèmic que hagués pogut modificar la seva evolució clínica.

En el segon treball vam escollir un tipus de SNPs descrits recentment, que poden interferir en la funció de miRNAs, coneguts com a miR-SNPs. Vam analitzar la influència de 11 miR-SNPs en la recaiguda del CPCNP en estadi precoç i després de la intervenció quirúrgica, en 175 pacients. Vam observar que els pacients amb el genotip *KRT81* rs3660 CC tenien un TR més curt que els pacients amb els genotips CG o GG i que els pacients amb el genotip *XPO5* rs11077 AA també presentaven un TR més curt que els pacients amb els genotips AC o CC. De manera interessant, aquests resultats continuaven essent significatius si analitzàvem el subgrup de pacients en estadi I. A més, en l'anàlisi multivariant, es confirmava que els dos genotips es comportaven com a variables pronòstiques independents per el TR. En l'anàlisi per SG, vam trobar una influència del genotip *MIR423* rs6505162, però aquest resultat no es mantenia en l'anàlisi multivariant. Addicionalment, la influència del SNP a *KRT81* era més marcada en el subgrup de pacients amb carcinoma escamós i aquest resultat ens va portar a realitzar anàlisis d'expressió de *KRT81* per immunohistoquímica, observant que *KRT81* és un marcador de diferenciació escamosa.

Fins el moment s'han reportat varis miR-SNPs com a marcadors de susceptibilitat a desenvolupar càncer de pulmó i també com a factors pronòstics per supervivència. Un SNP en el pre-miR-196a2 es va associar primerament amb la supervivència en CPCNP (224) i més tard a un risc incrementat de desenvolupar càncer de pulmó en població xinesa (221) i coreana (243). El SNP en el pre-miRNA miR-30c-1 rs928508 ha estat relacionat amb la supervivència en CPCNP, amb un efecte més gran en estadis I i II (244). Un altre SNP en la zona d'unió de miRNAs del gen *KRAS* ha estat

associat a un risc incrementat de CPCNP en fumadors moderats (232). Més recentment, un haplotip SNP en el gen *RNASEN*, implicat en la biogènesi dels miRNAs, s'ha associat amb una supervivència més curta en càncer de pulmó (236) i un altre SNP en un altre component de la maquinària de processament dels miRNAs, *AGO1*, s'ha relacionat amb un risc disminuït de càncer de pulmó (235). No obstant, no s'han reportat estudis que mostrin una relació directa entre miR-SNPs i recaiguda del CPCNP.

La exportina-5, codificada per *XPO5*, és la proteïna encarregada de transportar el pre-miRNA des del nucli fins al citosol. Un estudi recent no ha mostrat relació entre el SNP *XPO5* rs11077 i risc de càncer de pulmó en la població coreana (235). En canvi, en el present treball hem trobat una associació positiva entre aquest SNP i el TR del CPCNP operat, en la nostra població. Hipotetitzem que un SNP a *XPO5* podria alterar la funció normal de la proteïna en transportar els pre-miRNAs des del nucli, i per tant, podria alterar la regulació de múltiples miRNAs en la cèl·lula.

En l'estudi vam observar que la recurrència tumoral també estava influenciada per un SNP en el 3'-UTR de *KRT81*. Aquest SNP està localitzat en el lloc d'unió de varis miRNAs: miR-17, miR-93, miR-20b, miR-519d, miR-520g, miR-520h, miR-519c-3p, miR-519b-3p, miR-519a i miR-765. S'ha descrit que alguns d'aquests miRNAs estan alterats en CPCNP (196). A més, la presència d'aquest SNP afecta la seqüència específica d'unió d'aquests miRNAs, com es pot veure en la figura suplementària 4. La freqüència al·lèlica d'aquest SNP és diferent en pacients amb càncer comparat amb la població normal (184). El gen *KRT81* codifica per la proteïna queratina-81, que també es coneix com Hb-1, un tipus de queratina expressada en el cabell. Les queratines són proteïnes expressades en tots els tipus de cèl·lules epitelials (245), tenen diferents patrons d'expressió en els diferents carcinomes (246) i han estat usades extensament com a marcadors diagnòstics. Constitueixen els filaments intermitjos de les cèl·lules epitelials i estan involucrades en el manteniment de la integritat cel·lular i en la resistència a estressos mecànics i no mecànics (247). A més, les queratines no només estan relacionades en la regulació de funcions cel·lulars com la motilitat i el creixement cel·lular, sinó que també es relacionen amb la síntesi de proteïnes, la polarització apico-basal i la senyalització intracel·lular i també han estat descrites com a marcadors pronòstics en tumors epitelials (248). S'havia observat que els carcinomes de mama expressen ectòpicament *KRT81* (249) i en el present treball hem observat l'expressió de la proteïna per immunohistoquímica en teixit tumoral pulmonar.

KRT81 no ha estat prèviament validat com a marcador pronòstic i el present estudi és el primer en relacionar una variant de *KRT81* amb la recurrència tumoral en CPCNP.

Encara que no era un objectiu inicial del treball, l'estudi per immunohistoquímica de l'expressió de *KRT81* ens va portar a la troballa que podria ser un nou marcador immunohistoquímic de carcinoma escamós. El 95 % de carcinomes escamosos analitzats van ser positius per *KRT81* mentre que el 81% dels adenocarcinomes van ser negatius. A més, 3 dels 6 adenocarcinomes positius van mostrar només una positivitat focal. El marcador ens permetia diagnosticar el carcinoma escamós amb una sensibilitat del 95% i una especificitat de 81%. De forma interessant vam observar que en l'anàlisi per subgrups del TR dependent del subtipus histològic, l'efecte del genotip *KRT81* rs3660 en la recaiguda era més pronunciat en els pacients amb carcinoma escamós. El fet que varis tractaments nous dirigits a dianes moleculars son actius específicament en adenocarcinoma i altres no es poden usar en carcinoma escamós degut als seus potencials efectes adversos, implica que sigui actualment necessari subclassificar el CPCNP en escamós i no escamós. En aquest sentit, *KRT81* podria representar un nou marcador per al diagnòstic diferencial del CPCNP i podria ser afegit al panell de marcadors immunohistoquímics utilitzats fins l'actualitat com el TTF1 i p63 (250, 251).

Encara que existeixen certes limitacions, com la falta d'una sèrie de validació o d'estudis funcionals, aquest treball és el primer que ha mostrat un diferent patró de recaiguda de pacients amb CPCNP ressecat dependent de varis SNPs relacionats amb miRNAs.

En definitiva, en els dos treballs que conformen aquesta tesi, hem reportat una sèrie de SNPs que poden influenciar l'evolució clínica del CPCNP ressecat quirúrgicament. D'aquesta manera, hem identificat uns SNPs en gens de reparació del DNA, en gens implicats en la metabolització del tabac i en gens relacionats amb miRNAs que representen marcadors pronòstics de recidiva. Aquests SNPs estan localitzats en gens amb funcions molt variades, però tenen en comú que ens permeten identificar uns subgrups de pacients que tenen un risc més gran de recaure després del tractament curatiu que representa la cirurgia. Donada l'elevada taxa de recaiguda del CPCNP en estadi precoç, la troballa de biomarcadors per a predir el risc de recaiguda es fa necessària en la pràctica clínica.

A més del valor pronòstic global en CPCNP ressecat (estadis I-III), hem identificat dos SNPs que també tenen un paper pronòstic en l'estadi I, i això pot tenir importants implicacions clíniques, ja que biomarcadors que ens ajudin a identificar els pacients en estadi I que tenen un risc incrementat de recaiguda ens serien d'utilitat en el maneig clínic d'aquests pacients. Això és perquè actualment només els pacients amb CPCNP ressecat en estadi II i III són tractats de manera rutinària amb quimioteràpia adjuvant, ja que aquesta ha demostrat una millora en la supervivència en varis assajos clínics randomitzats (65-67, 252). No obstant, hi ha varis pacients en estadi I d'alt risc que també es podrien beneficiar del tractament i ha estat proposat que els pacients amb tumors de més 4 cm podrien tenir un benefici en la supervivència amb el tractament quimioteràpic adjuvant (69). Com que l'efecte en la recaiguda en el cas de les variants genètiques a *KRT81* i *XPO5* es mantenia en el subgrup de pacients en estadi I, nosaltres proposem que aquests SNPs són uns candidats ideals per investigar amb més profunditat i amb la finalitat de poder individualitzar els tractaments en aquests pacients.

L'evidència cada vegada més gran de la importància dels miRNAs en càncer fa que l'anàlisi de SNPs relacionats amb miRNAs, descrits recentment, pugui representar una eina important per a poder seleccionar els pacients i estratificar el risc.

Els presents treballs inclouen un número relativament petit de pacients, fet que fa que no puguem treure conclusions definitives sobre si recomanar o no quimioteràpia en aquests pacients o sobre la utilització rutinària d'aquests biomarcadors en clínica. No obstant, si aquests resultats es confirmessin en sèries més grans, i es validessin en estudis prospectius, aquests SNPs podrien representar una eina addicional per a individualitzar el tractament del càncer de pulmó.

VI. CONCLUSIONS

1. SNPs en gens de metabolització del tabac i en gens de reparació del DNA influencien en l'evolució clínica del CPCNP després de la resecció quirúrgica en pacients amb antecedents de tabaquisme.
2. El SNP rs2228001 en el gen XPC es un marcador independent de recaiguda en pacients en CPCNP amb antecedents de tabaquisme tractats quirúrgicament.
3. L'acumulació de genotips desfavorables en diferents vies de metabolització del tabac i de reparació del DNA incrementa el risc de recaiguda dels pacients amb CPCNP i antecedents de tabaquisme tractats quirúrgicament.
4. Els miR-SNPs tenen utilitat com a marcadors pronòstics en CPCNP.
5. El miR-SNP rs3660 localitzat en la regió 3' UTR del gen *KRT81* modifica el risc de recaiguda de pacients amb CPCNP precoç després de la resecció quirúrgica.
6. El miR-SNP rs11077 localitzat en la regió 3'UTR del gen que codifica per la proteïna de transport de miRNAs exportina 5 es relaciona amb el risc de recaiguda de pacients amb CPCNP precoç després de la resecció quirúrgica.
7. Els miR-SNPs rs3660 i rs11077 es mantenen com a marcadors de recaiguda en el subgrup de pacients en estadi I.
8. L'efecte del miR-SNP rs3660 en *KRT81* discrimina més eficientment pacients amb diferents taxes de recaiguda en el subgrup de pacients amb carcinoma escamós.
9. L'expressió proteica de *KRT81* és detectable per immunohistoquímica en el citoplasma de les cèl·lules de l'epiteli bronquiolar.
10. L'expressió de *KRT81* per immunohistoquímica és un marcador de diferenciació escamosa del CPCNP.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4):765-81.
3. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol*. 2008;3(8):819-31.
4. Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *International Journal of Cancer*. 2010;126(6):1454-66.
5. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010;19(8):1893-907.
6. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, Bertuccio P, Negri E, Boyle P, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Annals of Oncology*. 2009;21(6):1323-60.
7. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
8. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1-1438.
9. WHO. *Tobacco or Health: a global status report*. Geneva: WHO; 1997. p. 10-48.
10. Adler L. *Primary malignant growth of the lungs and bronchi*. New York: Longmans-Green; 1912.
11. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 1996;274(5286):430-2.
12. Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, et al. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(10):803-11.
13. Iribarren C, Tekawa IS, Sidney S, Friedman GD. Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1773-80.
14. Boffetta P, Pershagen G, Jockel KH, Forastiere F, Gaborieau V, Heinrich J, et al. Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(8):697-701.
15. Shapiro JA, Jacobs EJ, Thun MJ. Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(4):333-7.
16. Henley SJ, Thun MJ, Chao A, Calle EE. Association between exclusive pipe smoking and mortality from cancer and other diseases. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(11):853-61.

17. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004;328(7455):1519.
18. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194-210.
19. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21(48):7435-51.
20. Hecht SS, Kassie F, Hatsukami DK. Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(7):476-88.
21. Alberg AJ. Epidemiology of Lung Cancer: Looking to the Future. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(14):3175-85.
22. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):5-8.
23. Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, Wilson AF, Elston GZ, Ooi WL, et al. Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(15):1272-9.
24. Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bruske-Hohlfeld I, Muller KM, et al. Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol*. 1998;147(11):1028-37.
25. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*. 2004;75(3):460-74.
26. Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, Amos CI, Gu X, Strong LC. Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Hum Genet*. 2003;113(3):238-43.
27. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
29. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):778-90.
30. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1378(1):F21-59.
31. Breuer RH, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*. 2005;72(3):313-30.
32. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002;297(5578):63-4.
33. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):687-92.

34. Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, et al. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(1):252-7.
35. Daniel VC, Peacock CD, Watkins DN. Developmental signalling pathways in lung cancer. *Respirology*. 2006;11(3):234-40.
36. Chiang AC, Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2814-23.
37. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(12):895-902.
38. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(21):1609-15.
39. Valaitis J, Warren S, Gamble D. Increasing incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 1981;47(5):1042-6.
40. Travis WD, BE, Müller-Hermelink HK, Harris CC, editor. World Health Organization classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.
41. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-85.
42. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2001;31(2-3):139-48.
43. Nakanishi K. Alveolar epithelial hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 1990;114(4):363-8.
44. Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2001;10(1):77-82.
45. Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN. Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(2):97-102.
46. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(6):767-73.
47. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(9):1166-96.
48. Tomaszefski JF, Jr., Connors AF, Jr., Rosenthal ES, Hsiue IL. Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival. *Arch Pathol Lab Med*. 1990;114(5):468-74.
49. Chhieng DC, Cangiarella JF, Zakowski MF, Goswami S, Cohen JM, Yee HT. Use of thyroid transcription factor 1, PE-10, and cytokeratins 7 and 20 in discriminating between primary lung carcinomas and metastatic lesions in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer*. 2001;93(5):330-6.

50. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol*. 2002;15(1):6-10.
51. Conde E, Angulo B, Redondo P, Toldos O, Garcia-Garcia E, Suarez-Gauthier A, et al. The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung. *PLoS One*. 2010;5(8):e12209.
52. Takamori S, Noguchi M, Morinaga S, Goya T, Tsugane S, Kakegawa T, et al. Clinicopathologic characteristics of adenosquamous carcinoma of the lung. *Cancer*. 1991;67(3):649-54.
53. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):149S-60S.
54. Pretreatment evaluation of non-small-cell lung cancer. The American Thoracic Society and The European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(1):320-32.
55. Molina R, Auge JM, Bosch X, Escudero JM, Vinolas N, Marrades R, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology. *Tumour Biol*. 2009;30(3):121-9.
56. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706-14.
57. Schwartz AM, Henson DE. Diagnostic surgical pathology in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):78S-93S.
58. Rami-Porta R, Bolejack V, Goldstraw P. The new tumor, node, and metastasis staging system. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(1):44-51.
59. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(3):615-22; discussion 22-3.
60. Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2553-62.
61. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Porta RR, Waller D, Passlick B, et al. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;30(5):787-92.
62. Lim E, Baldwin D, Beckles M, Duffy J, Entwisle J, Faivre-Finn C, et al. Guidelines on the radical management of patients with lung cancer. *Thorax*. 2010;65 Suppl 3:iii1-27.
63. Healey TT, Dupuy DE. Radiofrequency ablation: a safe and effective treatment in nonoperative patients with early-stage lung cancer. *Cancer J*. 2011;17(1):33-7.
64. Vallieres E, Peters S, Van Houtte P, Dalal P, Lim E. Therapeutic advances in non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2011. Epub 2011/11/08.

65. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(4):351-60.
66. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, 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(9):719-27.
67. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(25):2589-97.
68. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3552-9.
69. Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant Paclitaxel Plus Carboplatin Compared With Observation in Stage IB Non-Small-Cell Lung Cancer: CALGB 9633 With the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5043-51.
70. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. *Lancet*. 1998;352(9124):257-63.
71. Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *J Clin Oncol*. 1991;9(9):1618-26.
72. Paesmans M, Sculier JP, Libert P, Bureau G, Dabouis G, Thiriaux J, et al. Prognostic factors for survival in advanced non-small-cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation algorithms in 1,052 patients. The European Lung Cancer Working Party. *J Clin Oncol*. 1995;13(5):1221-30.
73. Hoang T, Xu R, Schiller JH, Bonomi P, Johnson DH. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on eastern cooperative oncology group data. *J Clin Oncol*. 2005;23(1):175-83.
74. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2010;5(5):620-30.
75. Sun Z, Aubry MC, Deschamps C, Marks RS, Okuno SH, Williams BA, et al. Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: an analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;131(5):1014-20.
76. Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EV, Stukel TA, Lucas FL, Batista I, et al. Hospital volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2002;346(15):1128-37.

77. Bach PB, Cramer LD, Schrag D, Downey RJ, Gelfand SE, Begg CB. The influence of hospital volume on survival after resection for lung cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(3):181-8.
78. Gridelli C, Aapro M, Ardizzoni A, Balducci L, De Marinis F, Kelly K, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *J Clin Oncol.* 2005;23(13):3125-37.
79. Visbal AL, Williams BA, Nichols FC, 3rd, Marks RS, Jett JR, Aubry MC, et al. Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(1):209-15
80. Alexiou C, Onyeaka CV, Beggs D, Akar R, Beggs L, Salama FD, et al. Do women live longer following lung resection for carcinoma? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;21(2):319-25.
81. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Impact of comorbidity on lung cancer survival. *Int J Cancer.* 2003;103(6):792-802.
82. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest.* 2004;125(1):27-37.
83. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(1):11-20.
84. Seike M, Yanaihara N, Bowman ED, Zanetti KA, Budhu A, Kumamoto K, et al. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(16):1257-69.
85. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, Konishi H, Osada H, Tajima K, et al. 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(5):811-9.
86. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest.* 2005;127(3):978-83.
87. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006;355(10):983-91.
88. Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(8):800-8.
89. Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(10):1878-85.
90. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5240-7.
91. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323(9):561-5.

92. Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene*. 1993;8(9):2407-12.
93. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1118-28.
94. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(10):958-67.
95. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1991;27(11):1372-5.
96. Hsieh CC, Chow KC, Fahn HJ, Tsai CM, Li WY, Huang MH, et al. Prognostic significance of HER-2/neu overexpression in stage I adenocarcinoma of lung. *Ann Thorac Surg*. 1998;66(4):1159-63; discussion 63-4.
97. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87(10):1063-9.
98. Siegfried JM, Weissfeld LA, Luketich JD, Weyant RJ, Gubish CT, Landreneau RJ. The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1998;66(6):1915-8.
99. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(9):695-9.
100. Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I, et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of p16INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1997;80(3):389-95.
101. Hommura F, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Mishina T, Hiroumi H, Ogura S, et al. Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer*. 1999;81(4):696-701.
102. Passlick B, Siel W, Seen-Hibler R, Wockel W, Thetter O, Mutschler W, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(10):3944-8.
103. Aljada IS, Ramnath N, Donohue K, Harvey S, Brooks JJ, Wiseman SM, et al. Upregulation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein is associated with progression of human non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(16):3218-29.
104. Siel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003;103(5):647-51.
105. Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Creme E, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer*. 2005;103(8):1676-84.

106. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(4):861-7.
107. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 1998;8(12):1229-31.
108. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(11):5631-5.
109. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al. Genetic Variations in MicroRNA-Related Genes Are Novel Susceptibility Loci for Esophageal Cancer Risk. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008;1(6):460-9.
110. Monzo M, Navarro A, Ferrer G, Artells R. Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2008;10(10):628-37.
111. Marsh S. Pharmacogenomics. *Ann Oncol*. 2007;18 Suppl 9:ix24-8.
112. Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):147-57.
113. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):538-49.
114. Marsh S, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer*. 2004;90(1):8-11.
115. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(3):811-6.
116. Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, Navarro A, Perea G, Esteve J, et al. Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(12):4871-9.
117. Grau JJ, Caballero M, Monzo M, Munoz-Garcia C, Domingo-Domenech J, Navarro A, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenases and cytidine-deaminase gene polymorphisms as outcome predictors in resected gastric cancer patients treated with fluoropyrimidine adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol*. 2008;98(2):130-4.
118. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol*. 2002;3(8):461-9.
119. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(10):733-44.
120. Schuller HM, McGavin MD, Orloff M, Riechert A, Porter B. Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters. *Lab Invest*. 1995;73(3):448-56.
121. Hecht SS, Hochalter JB, Villalta PW, Murphy SE. 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12493-7.

122. Wiencke JK. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene*. 2002;21(48):7376-91.
123. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(6):611-50.
124. Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich FP. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 1995;8(1):136-42.
125. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem*. 1999;6(4):279-309.
126. Seidegard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect*. 1997;105 Suppl 4:791-9.
127. Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, et al. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res*. 2001;61(18):6708-12.
128. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev*. 1996;6(5):610-7.
129. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 1986;47(3):381-9.
130. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):802-32.
131. Lechapt-Zalcman E, Hurbain I, Lacave R, Commo F, Urban T, Antoine M, et al. MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur Respir J*. 1997;10(8):1837-43.
132. van der Deen M, Timens W, Timmer-Bosscha H, van der Strate BW, Scheper RJ, Postma DS, et al. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed Mrp1/Mdr1a/1b deficient mice. *Respir Res*. 2007;8:49.
133. Wang RB, Kuo CL, Lien LL, Lien EJ. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *J Clin Pharm Ther*. 2003;28(3):203-28.
134. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
135. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):22-33.
136. Bartsch H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res*. 1996;340(2-3):67-79.
137. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(1):3-28.
138. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996;15(4):273-80.

139. Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(1):27-41.
140. Kiyohara C, Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci.* 2007;4(2):59-71.
141. Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, et al. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(8):567-76.
142. Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2006;27(3):560-7.
143. Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(21):1764-72.
144. Shen H, Spitz MR, Qiao Y, Guo Z, Wang LE, Bosken CH, et al. Smoking, DNA repair capacity and risk of nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003;107(1):84-8.
145. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473-8.
146. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):507-18.
147. Hu Z, Wei Q, Wang X, Shen H. DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2004;46(1):1-10.
148. Wang H, Jin G, Liu G, Qian J, Jin L, Wei Q, et al. Genetic susceptibility of lung cancer associated with common variants in the 3' untranslated regions of the adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and ABCC1 candidate transporter genes for carcinogen export. *Cancer.* 2009;115(3):595-607.
149. Yoon SM, Hong YC, Park HJ, Lee JE, Kim SY, Kim JH, et al. The polymorphism and haplotypes of XRCC1 and survival of non-small-cell lung cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(3):885-91.
150. Takenaka T, Yano T, Kiyohara C, Miura N, Kouso H, Ohba T, et al. Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2010;67(1):101-7.
151. Kim M, Kang HG, Lee SY, Lee HC, Lee EB, Choi YY, et al. Comprehensive analysis of DNA repair gene polymorphisms and survival in patients with early stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2436-42.
152. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
153. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.

154. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4(1):199-227.
155. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell.* 2005;120(1):21-4.
156. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
157. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5848-56.
158. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
159. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2010;9(10):775-89.
160. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-69.
161. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):775-89.
162. Navarro A, Monzo M. MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells. *Yonsei Med J.* 2010;51(5):622-32.
163. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-4.
164. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008;30(4):460-71.
165. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell.* 2010;140(5):652-65.
166. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16230-5.
167. Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell.* 2010;140(1):111-22.
168. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle.* 2008;7(17):2643-6.
169. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
170. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *The Journal of Pathology.* 2011;223(2):102-15.
171. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol.* 2008;214(1):17-24.

172. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(4):1424-9.
173. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15805-10.
174. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature.* 2007;447(7148):1130-4.
175. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060-5.
176. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2130-4.
177. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood.* 2007;110(4):1330-3.
178. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 2008;14(1):35-42.
179. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Luo J, Mantha G, Sobol RW, et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007;67(5):2345-50.
180. Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol.* 2007;212(4):368-77.
181. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005;96(2):111-5.
182. Yang J, Zhou F, Xu T, Deng H, Ge YY, Zhang C, et al. Analysis of sequence variations in 59 microRNAs in hepatocellular carcinomas. *Mutat Res.* 2008;638(1-2):205-9.
183. Diederichs S, Haber DA. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. *Cancer Res.* 2006;66(12):6097-104.
184. Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin Y, Wang E, et al. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(13):4535-41.
185. Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(9):3300-5.
186. Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. *British Journal of Cancer.* 2010;103(8):1144-8.

187. Megiorni F, Pizzuti A, Frati L. Clinical Significance of MicroRNA Expression Profiles and Polymorphisms in Lung Cancer Development and Management. *Patholog Res Int.* 2011;2011:780652.
188. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 2007;67(16):7713-22.
189. Takamizawa J. Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Research.* 2004;64(11):3753-6.
190. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-98.
191. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-47.
192. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 2007;39(5):673-7.
193. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007;21(9):1025-30.
194. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell.* 2008;13(1):48-57.
195. Raponi M, Dossey L, Jatko T, Wu X, Chen G, Fan H, et al. MicroRNA Classifiers for Predicting Prognosis of Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2009;69(14):5776-83.
196. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection. *Cancer Res.* 2010;70(1):36-45.
197. Duncavage E, Goodgame B, Sezhiyan A, Govindan R, Pfeifer J. Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(11):1755-63.
198. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(10):1721-6.
199. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30(11):1903-9.
200. Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Vinolas N, Marrades RM, Gel B, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2011;103(5):411-5.
201. He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(11):819-22.
202. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are

frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009;69(13):5553-9.

203. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 2009;460(7254):529-33.

204. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic Assay Based on hsa-miR-205 Expression Distinguishes Squamous From Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2009;27(12):2030-7.

205. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):610-9.

206. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA Expression Differentiates Histology and Predicts Survival of Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):430-41.

207. Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, et al. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2870-8.

208. Mishra PJ, Humeniuk R, Longo-Sorbello GSA, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13513-8.

209. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics.* 2009;10(3):399-416.

210. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science.* 2005;310(5746):317-20.

211. Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle.* 2008;7(7):853-8.

212. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends in Genetics.* 2008;24(10):489-97.

213. Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis.* 2008;29(7):1306-11.

214. Mishra PJ. MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine. *Personalized Medicine.* 2009;6(2):119-25.

215. Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3300-5.

216. Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet.* 2007;16(9):1124-31.

217. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-801.

218. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin YC, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 2007;109(12):5079-86.
219. Wu M, Jolicoeur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D, et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1710-6.
220. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, et al. microRNA miR-196a-2 and Breast Cancer: A Genetic and Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Res*. 2009;69(14):5970-7.
221. Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, et al. A Functional Genetic Variant in microRNA-196a2 Is Associated with Increased Susceptibility of Lung Cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1183-7.
222. Peng S, Kuang Z, Sheng C, Zhang Y, Xu H, Cheng Q. Association of MicroRNA-196a-2 Gene Polymorphism with Gastric Cancer Risk in a Chinese Population. *Dig Dis Sci*. 2009;55(8):2288-93.
223. Christensen BC, Avissar-Whiting M, Ouellet LG, Butler RA, Nelson HH, McClean MD, et al. Mature MicroRNA Sequence Polymorphism in MIR196A2 Is Associated with Risk and Prognosis of Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3713-20.
224. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2600-8.
225. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of Genetic Variants in MicroRNA-Related Genes and Risk of Bladder Cancer. *Cancer Res*. 2008;68(7):2530-7.
226. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(20):7269-74.
227. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(5):1502-5.
228. Xu B, Feng N-H, Li P-C, Tao J, Wu D, Zhang Z-D, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate*. 2010;70:467-72.
229. Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2008;29(11):2126-31.
230. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):389-402.
231. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007;39(10):1278-84.

232. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, et al. A SNP in a let-7 microRNA Complementary Site in the KRAS 3' Untranslated Region Increases Non-Small Cell Lung Cancer Risk. *Cancer Res.* 2008;68(20):8535-40.
233. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(23):7956-62.
234. Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Li G, Wiley KE, et al. Sequence variants at 22q13 are associated with prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2009;69(1):10-5.
235. Kim J-S, Choi YY, Jin G, Kang H-G, Choi J-E, Jeon H-S, et al. Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: A two-stage case-control study. *Mol Carcinog.* 2010;49(10):913-21.
236. Rotunno M, Zhao Y, Bergen AW, Koshiol J, Burdette L, Rubagotti M, et al. Inherited polymorphisms in the RNA-mediated interference machinery affect microRNA expression and lung cancer survival. *Br J Cancer.* 2010;103(12):1870-4.
237. Bouchardy C, Mitrunen K, Wikman H, Husgafvel-Pursiainen K, Dayer P, Benhamou S, et al. N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics.* 1998;8(4):291-8.
238. Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM. The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett.* 2002;128(1-3):229-41.
239. Yin J, Vogel U, Guo L, Ma Y, Wang H. Lack of association between DNA repair gene ERCC1 polymorphism and risk of lung cancer in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;164(1):66-70.
240. Isla D, Sarries C, Rosell R, Alonso G, Domine M, Taron M, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(8):1194-203.
241. Pan JH, Han JX, Wu JM, Sheng LJ, Huang HN. CYP450 polymorphisms predict clinic outcomes to vinorelbine-based chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Acta Oncol.* 2007;46(3):361-6.
242. Vinolas N, Provencio M, Reguart N, Cardenal F, Alberola V, Sanchez-Torres JM, et al. Single nucleotide polymorphisms in MDR1 gen correlates with outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin plus vinorelbine. *Lung Cancer.* 2011;71(2):191-8.
243. Kim MJ, Yoo SS, Choi Y-Y, Park JY. A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer.* 2010;69(1):127-9.
244. Hu Z, Shu Y, Chen Y, Chen J, Dong J, Liu Y, et al. Genetic Polymorphisms in the Precursor MicroRNA Flanking Region and Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(5):641-8.
245. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982;31(1):11-24.

246. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(6):705-33.
247. Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(1):110-22.
248. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene.* 2010;30(2):127-38.
249. Regnier CH, Boulay A, Asch PH, Wendling C, Chenard MP, Tomasetto C, et al. Expression of a truncated form of hHb1 hair keratin in human breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1998;78(12):1640-4.
250. Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, CK 5/6, and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(4):415-20.
251. Ring BZ, Seitz RS, Beck RA, Shasteen WJ, Soltermann A, Arbogast S, et al. A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Modern Pathology.* 2009;22(8):1032-43.
252. Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 2004;350(17):1713-21.

VIII. ANNEX

Material suplementari del primer treball

APPENDIX TABLE 1

Genotypic frequencies, TTP, OS, and Log-Rank *P* values for all Genotypes (Wild-Type *versus* Homozygous for the Variant *versus* Heterozygous)

| Gene | Genotype (%) | Mean TTP, months | <i>P</i> value | Mean OS, months | <i>P</i> value |
|----------------------|--------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| CYP2C8 rs10509681 | TT (77.5) | 88.2 | 0.042 | 88.4 | 0.081 |
| | CC (4.2) | 27.5 | | 30 | |
| | CT (18.3) | 49.3 | | 61.3 | |
| GSTP1 rs1695 | AA (57.6) | 56.7 | 0.708 | 62.4 | 0.801 |
| | GG (28.8) | 54.5 | | 50 | |
| | AG (13.6) | 59.8 | | 64.8 | |
| EPOXH1 rs2234922 | GG (67.3) | 66.2 | 0.681 | 67.7 | 0.724 |
| | AA (8.6) | 68.9 | | 71.3 | |
| | AG (24.1) | 71.4 | | 71.1 | |
| EPOXH1 rs1051740 | TT (50.9) | 71.3 | 0.952 | 82.9 | 0.17 |
| | CC (15.8) | 60 | | 61.9 | |
| | CT (33.3) | 71 | | 52.2 | |
| NAT2 s1799930 | GG (70.8) | 61.1 | 0.019 | 73.5 | 0.254 |
| | AA (3.1) | —* | | —* | |
| | AG (26.1) | 107.6 | | 85.9 | |
| RCC1 rs735482 | AA (66.2) | 87.4 | 0.1 | 93.5 | 0.153 |
| | CC (21.1) | 56.5 | | 59.5 | |
| | AC (12.7) | 39.5 | | 50.5 | |
| ERCC2 rs13181 | GG (79.3) | 68.7 | 0.78 | 75.2 | 0.276 |
| | TT (6.9) | 82 | | 97.6 | |
| | TG (13.8) | 51.1 | | 38.1 | |
| ERCC5 rs17655 | CC (84.9) | 58.2 | 0.421 | 61.9 | 0.796 |
| | GG (1.9) | 23.5 | | —* | |
| | CG (13.2) | 86.4 | | 61.1 | |
| ERCC5 rs1047768 | CC (78.8) | 71 | 0.64 | 75 | 0.653 |
| | TT (15.4) | 67.1 | | 54.3 | |
| | CT (5.8) | 38.6 | | 43.1 | |
| XPA rs1800975 | GG (49) | 72.5 | 0.745 | 83.8 | 0.59 |
| | AA (23.5) | 71.8 | | 57.2 | |
| | AG (27.5) | 54.7 | | 59.8 | |
| XPC rs2228001 | AA (66.2) | 94.5 | 0.034 | 92.6 | 0.165 |
| | CC (22.1) | 50.4 | | 65.8 | |
| | AC (11.7) | 31 | | 41.7 | |
| MDR1 rs3842 | AA (56.9) | 79.8 | 0.25 | 80.7 | 0.077 |
| | GG (24.1) | 37.7 | | 37 | |
| | AG (19) | 68 | | 79.6 | |
| MDR1 rs1128503 | CC (57.2) | 69 | 0.954 | 78.9 | 0.71 |
| | TT (21.4) | 70.9 | | 59.9 | |
| | CT (21.4) | 61.3 | | 56.5 | |

*No mean time can be computed because all cases are censored.

Material suplementari del segon treball

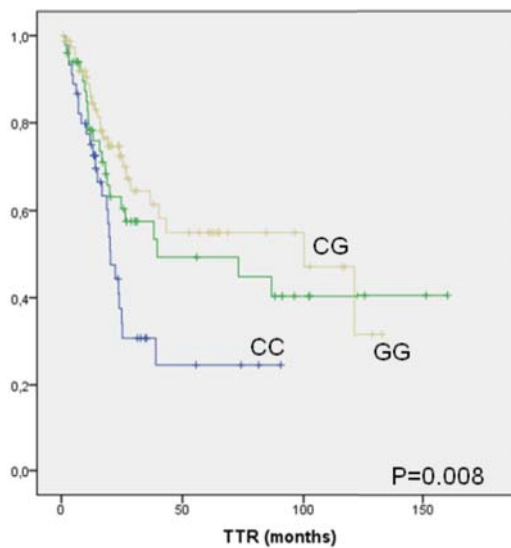


Figure S1. TTR according to *KRT81* rs3660 genotype.

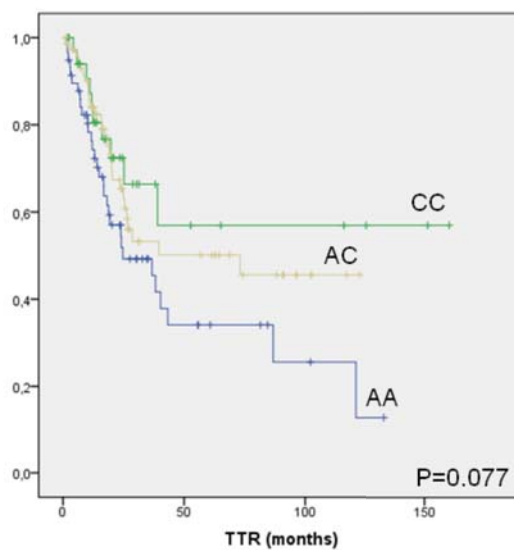


Figure S2. TTR according to *XPO5* rs11077 genotype.

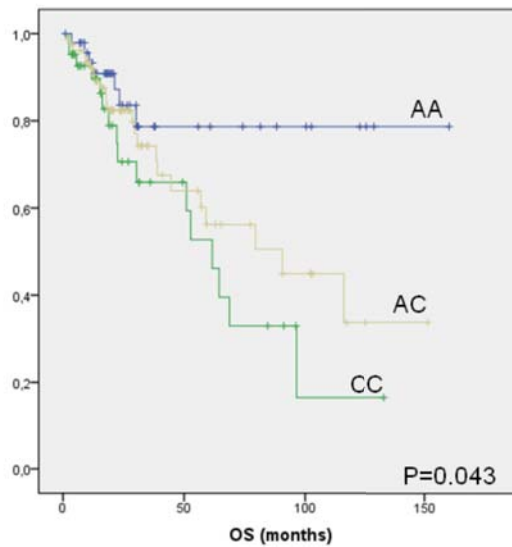


Figure S3. OS according to *MIR423* rs6505162 genotype.



Human *KRT81* 3' UTR

← 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 →

Gene
Human *KRT81* NT_002281.3' UTR length:341

Conserved sites for miRNA families broadly conserved among vertebrates
miR-17-5p/20/93.nf/106/519.d

Conserved sites for miRNA families conserved only among mammals

| | predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom) | seed match |
|---|---|------------|
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GAUGGACGUGAU&CU--CGUGAAAC | 7mer-m8 |
| hsa-miR-20b | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GAUGGACGUGACAUU--CGUGAAAA | 7mer-m8 |
| hsa-miR-106a | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GAUGGACGUGACAUU--CGUGAAAC | 7mer-m8 |
| hsa-miR-17 | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' UAGACGUGACAGU--CGUGAAAU | 7mer-m8 |
| hsa-miR-106b | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GAUGGACGUGAU&UU--CGUGAAAU | 7mer-m8 |
| hsa-miR-20a | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GAUGGACGUGCUUGUCGUGAAAC | 7mer-m8 |
| hsa-miR-93 | | |
| Position 101-107 of <i>KRT81</i> 3' UTR | 5' ...UCAGCUACUUCUCCUGCACUUUG... 3' GUG&GAUUUCCUCCUGUGAAAC | 7mer-m8 |
| hsa-miR-519d | | |

□ *KRT81* rs3660 G>C

Figure S4. Predicted conserved miRNAs targeting *KRT81*. SNP rs3660, located in the 3'UTR region of *KRT81*, affects the binding of these miRNAs.

Table S1. Immunostaining of KRT81 in the 80 cases analyzed.

| CASE | HISTOLOGY | SCORE | COMMENT |
|------|-----------|-------|---------------------------------|
| 1 | SCC | 1 | |
| 2 | SCC | 2 | |
| 3 | SCC | 2 | |
| 4 | SCC | 2 | |
| 5 | ADC | 0 | |
| 6 | ADC | 0 | |
| 7 | SCC | 2 | |
| 8 | ADC | 0 | |
| 9 | ADC | 1 | |
| 10 | ADC | 0 | |
| 11 | ADC | 0 | |
| 12 | ADC | 0 | |
| 13 | ADC | 2 | |
| 14 | SCC | 2 | |
| 15 | SCC | 2 | |
| 16 | SCC | 2 | |
| 17 | SCC | 2 | |
| 18 | ADC | 0 | |
| 19 | SCC | 2 | Previous neoadjuvant treatment. |
| 20 | SCC | 2 | |
| 21 | SCC | 2 | |
| 22 | ADC | 0 | |
| 23 | ADC | 0 | |
| 24 | ADC | 0 | |
| 25 | SCC | 2 | |
| 26 | SCC | 2 | |

| | | | |
|----|---------------|-----|---|
| 27 | SCC | 2 | |
| 28 | SCC | 2 | |
| 29 | SCC | 0 | Poorly differentiated SCC. Extensive necrotic component. |
| 30 | SCC | 2 | |
| 31 | Adenosquamous | 0 | |
| 32 | ADC | 0 | |
| 33 | ADC | 0 | |
| 34 | SCC | 2 | |
| 35 | SCC | 2 | |
| 36 | SCC | 2 | |
| 37 | SCC | 0 | |
| 38 | SCC | 2 | |
| 39 | SCC | 2 | |
| 40 | SCC | 2 | |
| 41 | SCC | 2 | |
| 42 | SCC | 2 | |
| 43 | SCC | 2 | |
| 44 | SCC | N/A | Extensive necrotic component. |
| 45 | SCC | 1 | |
| 46 | SCC | 2 | |
| 47 | Adenosquamous | 2 | Negative glandular areas and positive squamous areas. |
| 48 | SCC | 2 | |
| 49 | SCC | 2 | |
| 50 | SCC | N/A | Previous neoadjuvant treatment. No viable tumor. |
| 51 | SCC | 2 | |
| 52 | SCC | 1 | |
| 53 | SCC | 2 | |

| | | | |
|----|----------------|-----|---|
| 54 | SCC | 2 | |
| 55 | ADC | N/A | Previous neoadjuvant treatment. No viable tumor. |
| 56 | ADC | 0 | |
| 57 | ADC | 0 | |
| 58 | ADC | 0 | |
| 59 | ADC | 0 | |
| 60 | ADC | 0 | |
| 61 | ADC | 0 | |
| 62 | ADC | 0 | |
| 63 | ADC | 0 | |
| 64 | ADC | 1 | |
| 65 | ADC | 2 | Poorly differentiated adc. |
| 66 | ADC | 0 | |
| 67 | ADC | 2 | Poorly differentiated adc. |
| 68 | ADC | 1 | Extensive degenerative areas. |
| 69 | ADC | 0 | |
| 70 | ADC | 0 | |
| 71 | ADC | 0 | |
| 72 | ADC | 0 | |
| 73 | ADC | 0 | |
| 74 | SCC | 1 | |
| 75 | SCC | 2 | |
| 76 | SCC | 2 | |
| 77 | SCC | 2 | |
| 78 | Normal Control | - | |
| 79 | Normal Control | - | |
| 80 | Normal Control | - | |

ADC: Adenocarcinoma; SCC: squamous cell carcinoma; N/A: uninterpretable immunostaining

Altres treballs publicats durant el període de doctorat

- Grau JJ, Caballero M, Monzó M, Muñoz-García C, Domingo-Domenech J, Navarro A, Conill C, Campayo M, Bombí JA. Dihydropyrimidine dehydrogenases and cytidine-deaminase gene polymorphisms as outcome predictors in resected gastric cancer patients treated with fluoropyrimidine adjuvant chemotherapy. **J Surg Oncol** 2008;98:130–134
- Grau JJ, Caballero M, Campayo M, Jansa S, Vargas M, Alós L, Monzo M. Gene Single Nucleotide Polymorphism Accumulation Improves Survival in Advanced Head and Neck Cancer Patients Treated With Weekly Paclitaxel. **Laryngoscope** 2009;119:1484-1490
- Casas F, Viñolas N, Ferrer F, Agustí C, Sanchez M, Gimferrer JM, Lomeña F, Campayo M, Jeremic B. Long-term results of a phase II trial of induction Paclitaxel-Carboplatin followed by concurrent radiation therapy and weekly Paclitaxel and consolidation Paclitaxel-Carboplatin in stage III non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol** 2011;6:79-85
- Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, Campayo M, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. **J Surg Oncol** 2011;103:411–415