

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



**INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE ONCOLOGIA**

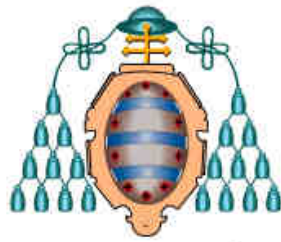
OBRA SOCIAL CAJASTUR

**Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias**

**“La Transición Epitelio-Mesénquima en Tumores
Neuroendocrinos”**

Tesis Doctoral

**José Alberto Galván Hernández
Octubre 2011**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE ONCOLOGIA

OBRA SOCIAL CAJASTUR

Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias

“La Transición Epitelio-Mesénquima en Tumores
Neuroendocrinos”

Tesis Doctoral

José A. Galván
Autor

Dra. Aurora Astudillo
Directora

Dra. M^a Victoria González
Directora

A mis padres y a Tata

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, con su apoyo científico y humano, han colaborado en la realización de este trabajo:

A mis directoras, la Dra. Aurora Astudillo González, ejemplo del trabajo constante, por confiar en mí desde el principio. Por su gran labor y profesionalidad en el desarrollo de este estudio, su dedicación y compromiso, compartiendo su escaso tiempo disponible de manera generosa. A la Dra. María Victoria González Meana, por aceptar la codirección de esta Tesis, por su presencia incondicional, su dedicación, su apoyo, sus apreciadas y relevantes correcciones, críticas, comentarios y sugerencias, sin los cuales la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeras de laboratorio Marta S. Pitiot, Vanessa García, Mamen Muñiz y mis compañeras del hospital Irene Centeno, Ana S. Pitiot y Lucía Fernández, por apoyarme estos cinco años que inicié esta etapa en mi vida. Por ayudarme diariamente en mi trabajo de laboratorio, por todos los buenos momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio, por sus valiosos consejos tanto en lo profesional como en lo personal y, en definitiva, por ser las mejores compañeras y amigas que se puede tener.

También a Aitana Vallina, por el apoyo brindado desde el principio y por ser la mejor experta en la realización *tissue-microarrays*, sin los cuales no hubiera ganado tiempo para la finalización de este trabajo.

A todo el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA, en especial a los técnicos de laboratorio Laura Suárez, Isabel, Nieves e Inés, por su inestimable ayuda, proporcionándome las muestras y material para la inmunohistoquímica. Al Servicio de Anatomía Patológica del INS y del Centro Médico de Asturias por facilitarme las muestras de carcinomas de célula pequeña.

Al Registro Hospitalario de Tumores y en especial a la Dra. Victoria Folgueras, por facilitarme las historias clínicas y datos sobre el seguimiento y supervivencia de los pacientes.

A todo el equipo de Oncología Molecular, en especial a la Dra. Milagros Balbín, por su desinteresada colaboración y por facilitarme su laboratorio para la realización de las técnicas de Biología Molecular. Al Dr. Iñigo Santamaría, por enseñarme nuevas técnicas, por su infinita paciencia y sus buenos consejos. El resto del personal, Marta González, Pilar Valdés, y Ana Lastra, ejemplos de bondad, generosidad y profesionalidad, vuestra ayuda ha sido esencial.

A la Dra. Olivia Suárez por sus consejos en la realización de las técnicas de IHQ e IF, así como a Marta Alonso Guervós por su incondicional apoyo en el Servicio de Microscopia Confocal y análisis de imagen.

Al Servicio de Oncología Médica del HUCA y en especial al Dr. Guillermo Crespo y a la Dra. Paula Jiménez Fonseca, que generosamente me han aportados los datos clínicos. Su especial interés por los TNE me ha motivado a seguir adelante.

A la Dra. Amparo Cano y Dra. Gema Moreno, por acogerme de manera generosa durante 2 semanas en su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (Madrid). Durante esta estancia pude profundizar en los conocimientos de TEM y conocer nuevos protocolos de IHQ para la detección de Snail.

A la Dra. Rocío García Carbonero, por proporcionarme más casos de TNEGEP que mejoraron los análisis estadísticos.

Al IUOPA, marco en el que se desarrolló este trabajo, en especial a Silvia Salas por su ayuda en los trámites necesarios para presentar este trabajo y su servicio durante todo este tiempo. Al Gobierno del Principado de Asturias a través de la Fundación para el fomento en Asturias de la Investigación Científica aplicada Y la Tecnología (FICYT), por concederme la beca predoctoral.

A mis amigas de siempre Marta, Nati, Idaira, Ari y a mis amigos en Asturias, Jose, Felipe, Abraham y Enrique, por estar siempre ahí.

A Jorge, por la maquetación de la Tesis, sus brillantes ideas y consejos en el diseño, y por tantas cosas que él ya sabe, que no cabrían aquí.

A mis hermanos, cuñados, sobrinos y padrinos, por su apoyo incondicional y en especial a mis padres y a Tata, a los cuales dedico este trabajo porque sin ellos nada hubiera sido posible.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL SISTEMA NEUROENDOCRINO DIFUSO	1
1.2. TUMORES NEUROENDOCRINOS	3
1.2.1. <i>Definición</i>	3
1.2.2. <i>Marcadores anatomopatológicos de diferenciación neuroendocrina.</i>	4
1.3. CLASIFICACIÓN DE TUMORES NEUROENDOCRINOS.....	6
1.3.1. <i>Gastroenteropancreáticos</i>	6
1.3.2. <i>Pulmonares</i>	9
1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES NEUROENDOCRINOS	10
1.4.1. <i>Gastroenteropancreáticos</i>	11
1.4.2. <i>Pulmonares</i>	14
1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS TUMORES NEUROENDOCRINOS.....	14
1.5.1. <i>Gastroenteropancreáticos.</i>	14
1.5.2. <i>Pulmonares</i>	16
1.6. ALTERACIONES GENÉTICO-MOLECULARES EN TUMORES NEUROENDOCRINOS.....	16
1.6.1. <i>Gastroenteropancreáticos.</i>	16
1.6.2. <i>Pulmonares</i>	17
1.7. PROGRESIÓN TUMORAL: TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMA, INVASIÓN Y METASTASIS	18
1.7.1. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA: UN PROCESO COMÚN EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y EN LA CARCINOGENÉISIS.....	21
1.7.1.1. <i>Inducción y regulación de la Transición Epitelio- Mesénquima</i>	22
1.7.1.2. <i>Pérdida de la expresión y/o función de la Cadherina-E en la Transición Epitelio-Mesénquima.</i>	25
1.7.2. MECANISMOS RESPONSABLES DE LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN Y/O FUNCIÓN DE LA CADHERINA-E: REPRESORES TRANSCRIPSIONALES	27
1.7.2.1. <i>Represores transcripcionales de la familia Snail</i>	28
1.7.2.2. <i>Represor transcripcional Twist.</i>	31
1.7.2.3. <i>“Switch” de cadherinas</i>	32
1.7.2.4. <i>Proteínas Fox</i>	33

2. HIPÓTESIS.....	35
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS	36
4.2. ELABORACIÓN DE MATRICES DE TEJIDO	39
4.3. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA	40
4.4. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.	42
4.5. VALORACIÓN DE LAS TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	43
4.6. AISLAMIENTO DE ARN	43
4.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN	43
4.8. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA (RT-Q-PCR).....	44
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. ANÁLISIS DE LA SERIE DE TNE DE PULMÓN.....	49
5.1.1. <i>Análisis inmunohistoquímico en el epitelio respiratorio sano.....</i>	<i>49</i>
5.1.2. <i>Frecuencias de las valoraciones moleculares en los TNE de pulmón</i>	<i>50</i>
5.1.3. <i>Asociaciones entre las variables clínico-patológicas y valoraciones moleculares en TNE de Pulmón</i>	<i>51</i>
5.1.3.1. <i>Diagnóstico diferencial entre subtipos tumorales de TNE de Pulmón..</i>	<i>53</i>
5.1.4. <i>Asociación entre las variables moleculares</i>	<i>54</i>
5.1.5. <i>Análisis de la expresión ARNm mediante RT-PCR cuantitativa: correlaciones</i>	<i>55</i>
5.1.6. <i>Análisis de Inmunofluorescencia (IF) de la expresión proteica de Snail1 en el tejido normal pulmonar.</i>	<i>56</i>
5.1.7. <i>Análisis de supervivencia en TNE de Pulmón.....</i>	<i>57</i>
5.1.7.1. <i>Análisis de supervivencia de Carcinoides Típicos</i>	<i>63</i>
5.2. ANÁLISIS DE LA SERIE DE TNE-GEP	64
5.2.1. <i>Análisis inmunohistoquímico en el epitelio intestinal sano</i>	<i>66</i>
5.2.2. <i>Frecuencias de las valoraciones moleculares en los TNE GEP.....</i>	<i>67</i>
5.2.3. <i>Asociación entre las variables clínico-patológicas y valoraciones moleculares en TNE GEP.....</i>	<i>68</i>
5.2.3.1. <i>Diagnóstico diferencial entre subtipos tumorales de TNEGEP</i>	<i>70</i>
5.2.4. <i>Asociaciones entre las valoraciones moleculares en TNE GEP.....</i>	<i>70</i>

5.2.5. <i>Análisis de supervivencia en TNE GEP</i>	71
5.2.5.1. Diferencias en la supervivencia entre Carcinoides TNE G1.....	74
6. DISCUSIÓN	76
7. CONCLUSIONES	84
8. ANEXOS	85
TABLA 8.1.: CORRELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y VALORACIONES MOLECULARES DE IHQ EN TNE DE PULMÓN.	84
TABLA 8.2.: CORRELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS DISTINTAS VALORACIONES MOLECULARES POR IHQ EN TNE DE PULMÓN.....	85
TABLA 8.3.: CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CLÍNICO- PATOLÓGICAS Y VALORACIONES MOLECULARES POR IHQ EN TNEGEP	86
TABLA 8.4.: CORRELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS DISTINTAS VALORACIONES MOLECULARES POR IHQ EN TNEGEP	87
9. BIBLIOGRAFIA	91

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SISTEMA NEUROENDOCRINO DIFUSO

Los tumores neuroendocrinos se originan a partir de las células que componen el sistema neuroendocrino difuso (SND). Estas células se caracterizan porque producen neuropéptidos, neuromoduladores y/o neurotransmisores, contenidos en gránulos de secreción en su citoplasma, pero a diferencia de las células nerviosas, carecen de axones y conexiones sinápticas. El SND cuenta con aproximadamente 13 tipos de células neuroendocrinas diferentes que secretan al menos 33 péptidos y aminas biológicas¹ (Tabla 1).

Las células del sistema neuroendocrino difuso se encuentran distribuidas de forma difusa en el tracto gastrointestinal y en el páncreas, así como en la vía biliar, tracto urogenital, timo, tiroides (células C) y en la piel. A pesar de que el porcentaje de células neuroendocrinas del tracto gastrointestinal representa el 1% del epitelio, en conjunto constituyen el mayor órgano endocrino del organismo^{2, 3}. Fisiológicamente, estas moléculas están implicadas en multitud de funciones: la regulación de la homeostasis de la glucosa, la secreción pancreática exocrina, la motilidad y el vaciamiento gástrico, y la proliferación intestinal⁴⁻⁶.

Las células neuroendocrinas del aparato respiratorio están distribuidas entre las células epiteliales de manera individual o bien formando racimos, llamados “cuerpos neuroendocrinos”^{7, 8}. Las células individuales están localizadas en el epitelio respiratorio nasal, en la mucosa laríngea y a lo largo de todo el tracto respiratorio, desde la tráquea hasta las vías aéreas terminales¹. Los cuerpos neuroendocrinos, descritos la primera vez por Frölich en 1949, son *clusters* de 4 a 10 células neuroendocrinas, localizados debajo de la membrana basal, tanto en bronquios, bronquiolos como en alveolos⁹. Los cuerpos neuroendocrinos participan en la quimiorrecepción, en la vasoconstricción de los capilares en momentos de hipoxia, en la regulación del crecimiento localizado, sobre todo en la etapa fetal¹⁰, así como en la regeneración de las células epiteliales, a través de un mecanismo de secreción paracrina¹¹.

G	<i>Gastrina</i>	N	<i>Neurotensina</i>
ECL	<i>Histamina</i>	B	<i>Insulina</i>
D	<i>Somatostatina</i>	A	<i>Glucagón</i>
EC	<i>Serotonina/Substancia P/Gaunilina/Melatonina</i>	P	<i>Bombesina (GRP)</i>
I	<i>Colecistokinina (CCK)</i>	M	<i>Motilina</i>
K	<i>Péptido gastrointestinal (GIP)</i>	Gr	<i>Grelina</i>
S	<i>Secretina</i>	X	<i>Amylina</i>
F	<i>Polipéptido pancreático</i>	C	<i>Calcitonina</i>
L	<i>Enteroglucagón y péptido YY</i>	DI/IV	<i>Peptido Vasoactivo Intestinal (VIP)</i>

En cuanto al origen embriológico, inicialmente se pensó que las células neuroendocrinas derivaban del neuroectodermo, ya que se comprobó que compartían características comunes con las neuronas: expresaban marcadores de diferenciación neural implicados en la biosíntesis de neurotransmisores (detectados por inmunohistoquímica) y mostraban propiedades ultraestructurales comunes. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo posteriormente por el embriólogo francés Le Douarin en los años 60, demostraron que las células del SND, eran de origen endodérmico¹².

La identificación inicial de estas células se llevó a cabo mediante sales de cromo, por las que muestran afinidad (células *cromafines*). Posteriormente se descubrió su afinidad por las sales de plata (condición llamada *argirofilia*). Si se hace preciso el uso de un agente reductor para la detección de la plata, las células se denominan *argentafines* y, cuando las propias células son capaces de reducir la plata sin necesidad de otro agente, se denominan *argenterreductoras*.

A nivel molecular, recientes estudios han revelado la importancia de la ruta de señalización Notch en el control de la diferenciación neuroendocrina. Entre los factores de transcripción que responden a dicha vía destacan Math-1, Neurogenina-3, Beta2/NeuroD, Pax4 y Pax6, de tipo bHLH (del inglés *basic Helix-Loop-Helix*)¹³⁻¹⁵.

1.2. TUMORES NEUROENDOCRINOS

1.2.1. Definición

El término “neuroendocrino” hace referencia a un fenotipo celular característico, resultado de la acción de múltiples genes expresados en el sistema endocrino y en el sistema nervioso. En la comunidad científica muchos investigadores no consideran adecuado usar el término “neuroendocrino” para referirse a células o tumores de origen embriológico endodérmico. Un ejemplo de ello es que la clasificación de la OMS para estas neoplasias¹⁶ del año 2000, designaba a los tumores gastroenteropancreáticos de esta naturaleza bajo el término de “tumor endocrino”. Sin embargo, la última clasificación de la OMS del año 2010¹⁷ recomienda de nuevo el uso del término “neuroendocrino”, ya que define claramente las características fenotípicas de las células del SND y a los tumores originados a partir de ellas.

Los tumores neuroendocrinos fueron identificados por primera vez por Kultschitzky a mediados del siglo XIX, como un tipo específico de neoplasias con un crecimiento peculiar, de características cromafines en la base de las criptas de *Lieberkühn* del intestino¹⁸. Se les denominó en sus inicios como *karcinoide*, término empleado por primera vez en 1907 por Oberndorfer¹⁹, quien separó a los carcinoides de los adenocarcinomas de intestino, constituyendo un grupo bien definido de neoplasias de cierta naturaleza benigna. Uniendo las dos observaciones anteriores, Masson propuso por primera vez que los tumores carcinoides eran de naturaleza endocrina²⁰. Posteriormente, Feyter consideró que las células descritas por Kultschitzky eran parte de un sistema de células endocrinas con una distribución amplia por el organismo de características fenotípicas comunes pero con funciones diversas²¹.

A nivel morfológico, los TNE se reconocen por su arquitectura histológica característica, según la cual se pueden agrupar en 4 tipos diferentes:

Tipo A, formando empalizada periférica o insular

Tipo B, formando trabéculas

Tipo C, acinar o glandular

Tipo D, formas mixtas.

Las células tumorales que los constituyen presentan núcleos monoformos, en general redondeados, de cromatina reticulada finamente granular y citoplasma de bordes

definidos levemente eosinofílicos, en cuyo interior se suele observar cierta granularidad fina, más evidente con tinciones especiales, que revelan los gránulos de neurosecreción invariablemente presentes^{22, 23}. Estos se manifiestan a nivel ultraestructural como gránulos de neurosecreción electrodensos (> 80nm).

Aunque son tumores poco frecuentes, han sido siempre motivo de estudio para muchos investigadores debido a la dificultad que plantea su diagnóstico, clasificación y un tratamiento adecuado al paciente. Esta dificultad se debe fundamentalmente a:

1. Su heterogeneidad, tanto en la localización como en la histología, lo que dificulta disponer de una clasificación uniforme.
2. La actividad hormonal que a veces pueden presentar algunas neoplasias endocrinas, ocasionando síndromes clínicos por hipersecreción hormonal.
3. La baja correlación existente entre la morfología y el comportamiento biológico, que dificulta predecir su pronóstico.
4. Su baja frecuencia, que hace que el conocimiento y experiencia sobre ellos sean limitados.

1.2.2. Marcadores anatomopatológicos de diferenciación neuroendocrina

Para el diagnóstico anatómico-patológico de TNEs es necesaria la detección inmunohistoquímica de marcadores de diferenciación neuroendocrina. Para dicho diagnóstico se acepta la necesidad de resultado positivo para al menos dos marcadores²⁴. Estos marcadores se pueden clasificar de acuerdo a su localización:

- a) De gránulo neurosecretor
- b) De membrana celular
- c) Citoplásmicos
- d) De citoesqueleto
- e) Nucleares

a) De gránulo neurosecretor: las **cromograninas A, B y C**, son glicoproteínas solubles identificadas en el interior de los gránulos de neurosecreción grandes (Figura 1). Su función biológica es poco conocida, pero sí se sabe que contribuye a la biogénesis, transporte, almacenamiento y liberación de catecolaminas y otras hormonas peptídicas. La más conocida de las graninas es la tipo A, presente en la mayoría de tumores neuroendocrinos bien diferenciados y generalmente ausente en los tumores pobremente diferenciados²⁵. En los últimos años, ha sido posible detectar la

cromogranina A en suero, con el fin de valorar el seguimiento de los pacientes, detección de tumores no funcionantes, respuestas a terapias, etc^{26, 27}.

Entre los marcadores específicos del tipo de secreción, se encuentran las **aminas** y **neuropéptidos** que estos tumores producen (Tabla 1). En función del tipo de secreción unihormonal, se define al tipo de TNE originado a partir de dicha célula como tumor funcionante, y a cada uno se le denomina de acuerdo a la hormona que producen. Así, los tumores productores de gastrina son denominados gastrinomas; los productores de insulina, insulinomas; los productores de glucagón, glucagonoma; etc²⁸. Esta hipersecreción hormonal al pasar a la sangre produce los síntomas generales característicos que pueden constituir el primer indicio de la presencia del tumor.

b) De membrana celular

La **sinaptofisina** es otra glicoproteína abundante en las membranas de las vesículas sinápticas y en las células neuroendocrinas, tanto de estirpe neural como epitelial, generando un patrón de membrana y citoplásmico respectivamente. Aunque no es específica de TNE es, junto con la cromogranina, un marcador relevante en el diagnóstico de rutina de dichos tumores (Figura 1).

Otra molécula de superficie de membrana es **CD56**, o **NCAM**, una proteína de adhesión específica del tejido neural.

c) Citoplásmicos

La **enolasa** específica neuronal tipo γ - γ es una enzima presente en células nerviosas y neuroendocrinas. Es un marcador de baja especificidad en el diagnóstico de los TNE. También destaca **PGP9.5**, proteasa del grupo de las ubiquitin C-terminal hidroxilasas, que está presente en neuronas y en TNE, y de comportamiento similar a la enolasa. Su especificidad es baja, ya que puede ser positiva en tumores no neuroendocrinos.

d) De citoesqueleto

Entre éstos destacan una de las isoformas de la **β -tubulina** y la forma **fosforilada β III tubulina**, cuya expresión ha sido descrita en el cerebro en desarrollo y en tumores neuroendocrinos derivados del intestino primitivo. Su expresión ha sido asociada con el grado de malignidad en los tumores neuroendocrinos pulmonares. También se ha asociado con los tumores gastroenteropancreáticos aunque sin correlación con el grado tumoral²⁹.

e) Nucleares

Cabe destacar el factor de transcripción **CDX2**, implicado en el desarrollo del intestino y marcador de las células del SND, mientras que **TTF1** es un factor de transcripción activador surfactante en el pulmón, útil para la identificación del origen pulmonar en tumores secundarios (Figura 1).

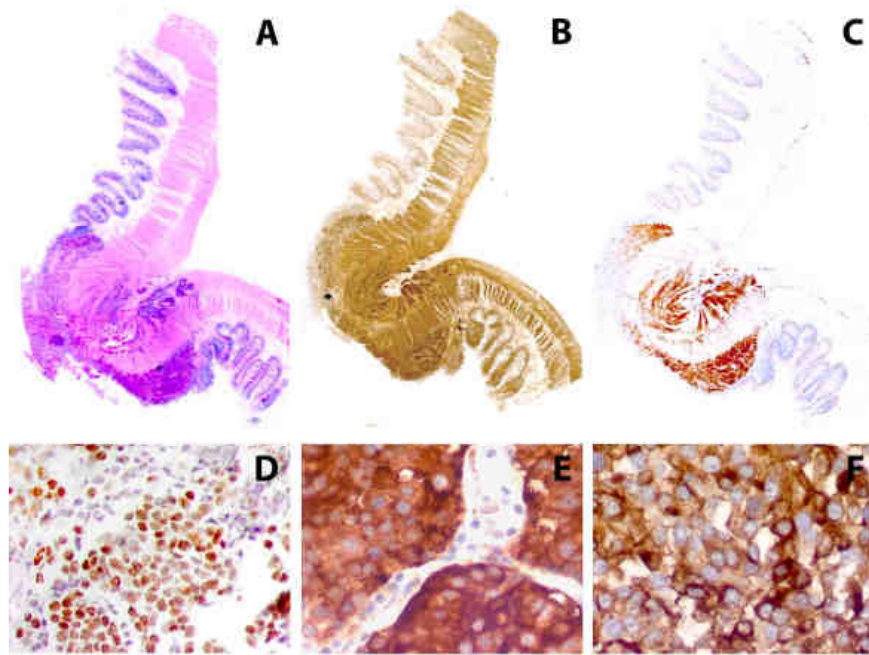


Figura 1: Primera Fila: Tumor Neuroendocrino Gastrointestinal A: H&E, B: Expresión IHQ de Sinaptofisina, C: Expresión IHQ de cromgraninaA. Segunda fila: Tumor Neuroendocrino de Pulmón D: Expresión IHQ de TTF1, E: Expresión IHQ de Sinaptofisina, F: Expresión IHQ de CromograninaA

1.3. CLASIFICACIÓN DE TUMORES NEUROENDOCRINOS

1.3.1. Gastroenteropancreáticos

La diversidad funcional existente entre las diferentes células que componen el sistema neuroendocrino difuso, su distribución aleatoria, la falta de consenso por parte de muchos autores en el uso de la nomenclatura, los escasos conocimientos de la biología molecular de TNE, son algunas de las razones por las que la clasificación de los TNE ha sido siempre un reto complicado para muchos investigadores. En 1963, Williams y Sandler³⁰ clasificaron los TNEGEP en:

- tumores del intestino superior (que incluye estómago, duodeno, yeyuno superior y páncreas)
- tumores del intestino medio (yeyuno inferior, íleon, apéndice y ciego)
- tumores del intestino posterior (colon y recto)

Posteriormente la clasificación de la OMS del año 2000¹⁶ estaba basada en trabajos previos³¹⁻³³, distinguiendo entre tumores puramente endocrinos y tumores mixtos (endocrinos-exocrinos), e identificando cuatro categorías tumorales (1. Tumor endocrino bien diferenciado benigno, 2. de comportamiento incierto, 3. Carcinoma Endocrino bien diferenciado de bajo grado y 4. Carcinoma Endocrino poco diferenciado de alto grado), lesiones que son clasificadas independientemente del sitio de origen, basados en la diferenciación histológica, invasión tumoral, angioinvasión e índice de proliferación.

En el año 2010, la OMS publicó la última clasificación para estas neoplasias¹⁷. Se ha simplificado todo lo publicado hasta ahora, en un enfoque más patológico, basado en datos uniformes y reproducibles para el manejo clínico de pacientes con TNEs^{34, 35}. La terminología actual se basa en el grado tumoral, calculado previamente según el índice mitótico y el índice de proliferación (% de Ki67). Además, la clasificación los define en su conjunto como neoplasias potencialmente malignas, aunque sean de grado bajo o intermedio, tal y como ocurre en la clasificación de TNE de pulmón.

Se distinguen 4 subtipos, definidos por la OMS de la siguiente manera (Figura 2):

1. **Tumor Neuroendocrino (G1) (TNEG1):** Neoplasia neuroendocrina bien diferenciada, compuesta por células con resgos similares a la célula endocrina del SND, que expresan marcadores de diferenciación neuroendocrina (Sinaptofisina y cromogranina) con ligera a moderada atipia nuclear y bajo índice mitótico (<2 mitosis x10CGA) y bajo índice de proliferación (<2% de Ki67).
2. **Tumor Neuroendocrino (G2) (TNEG2):** idéntica definición a tipo 1 pero la diferencia radica en el índice mitótico (3-20 mitosis x10CGA y 3-20% Ki67).
3. **Carcinoma Neuroendocrino (G3) (CNEG3-CG):** Carcinoma Neuroendocrino de Célula Grande: Neoplasia neuroendocrina poco diferenciada de alto potencial de malignidad, de células grandes, a veces con

arquitectura organoide, marcada atipia, necrosis multifocal, con alto índice mitótico (>20 mitosis $\times 10$ CGA) y alto índice proliferativo ($>20\%$ de Ki67).

4. **Carcinoma Neuroendocrino (G3), Carcinoma de Célula Pequeña (CNEG3-CP)** idéntica definición al tipo 3 salvo que las células son de aspecto linfocitario (Tipo *oat cell*), de escaso citoplasma y con extensas zonas de necrosis.

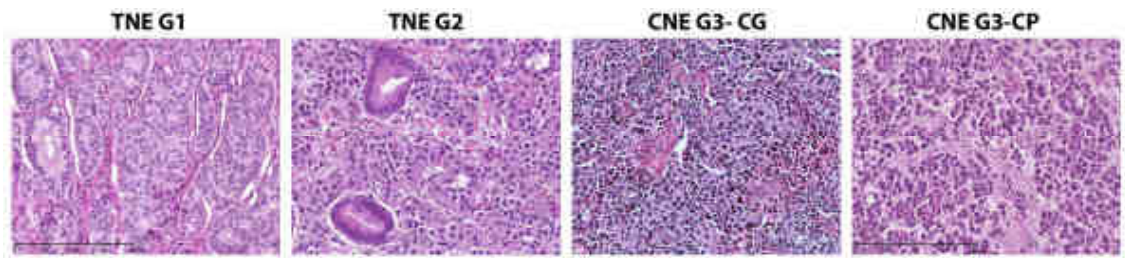


Figura 2: Subtipos de TNEGEP

En la Tabla 2 se resume esta clasificación y los criterios propuestos por la OMS:

Tabla 2: Criterios de la OMS para la clasificación de TNEGEP						
Tipo Tumoral	Grado	Índice mitótico	%Ki67	Tamaño celular	Diferenciación	Necrosis
TNE	1	<2	<2	Tipo carcinoide	BD	-
TNE	2	3-20	2-20	Tipo carcinoide	BD	+ (focal)
CNE	3	>20	>20	Grande	PD	+
CNE	3	>20	>20	Pequeña	PD	+

Además, el diagnóstico debe indicar si el tumor es bien diferenciado (correspondería a los G1 y G2) o poco diferenciado (correspondería a los G3). Un diagnóstico de “Tumor Neuroendocrino”, “Neoplasia Neuroendocrina” o “Carcinoma Neuroendocrino” sin referencia al grado ni a la diferenciación sería inadecuado para establecer un pronóstico y tratamiento adecuado.

Debido al interés de estandarizar la estratificación y tratamiento de pacientes con estas neoplasias y teniendo en cuenta que el comportamiento agresivo de estos tumores no se correlaciona con el grado de proliferación, la Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos (ENETS) y por otro lado el Comité Estadounidense para el Cáncer (AJCC) desarrollaron hace unos años guías que recogían pautas a seguir en el

diagnóstico y tratamiento de dichos pacientes y así establecer el sistema TNM (Tumor/Nódulos/Metástasis) en dichos tumores, según el sitio anatómico^{36 37}.

Es por ello que, la actual clasificación de la OMS para TNEGEP, tras un consenso, validó el sistema TNM propuesto para dichas neoplasias.

En resumen, esta última clasificación recomienda que el diagnóstico de TNEGEP sea de acuerdo al grado tumoral, la diferenciación histológica y el estadio sitio-específico, que definen de forma clara al tumor en cuestión, lo cual facilita una clara comunicación entre todos los profesionales involucrados en el tratamiento y seguimiento personalizado de cada paciente.

1.3.2. Pulmonares

La clasificación de los tumores neuroendocrinos de pulmón también ha resultado muy compleja y confusa. A lo largo de cinco décadas, diversos autores han propuesto diferentes clasificaciones, en un principio basadas puramente en la morfología y el comportamiento clínico. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular, ha contribuido a una reestructuración de todos los tipos de tumores con diferentes nomenclaturas y nuevas categorías de clasificación.

La actual clasificación de la Organización Mundial para la Salud (OMS), de 2004, para los Tumores Neuroendocrinos de Pulmón³⁸ incluye la propuesta por Travis W. D. y col., en la que se establece una definición de los tipos histológicos basada en datos morfológicos convencionales (patrón de crecimiento organoide, índice mitótico y presencia de necrosis) e inmunohistoquímicos, comunes en todos los tumores neuroendocrinos, con implicaciones pronósticas y terapéuticas (Tabla 3). Esta clasificación incluye los TNEs de pulmón en las neoplasias epiteliales malignas y distingue 4 subtipos tumorales:

1. **Carcinoides típicos (CT):** «Tumores neuroendocrinos bien diferenciados, de bajo potencial de malignidad. Los núcleos muestran cromatina en “sal y pimienta” y típico patrón “organoide” (arquitectura en nidos, trabéculas y rosetas) con extensa vascularización».
2. **Carcinoides atípicos (CA):** «Tumores neuroendocrinos bien diferenciados de potencial de malignidad intermedio, con características morfológicas similares al carcinoide típico».

3. **Carcinoma Neuroendocrino de Célula Grande (CNCG):** «Tumores neuroendocrinos poco diferenciados de alto potencial de malignidad, con patrón neuroendocrino, y de tamaño celular aproximadamente el de 3 linfocitos».
4. **Carcinoma de Pulmón de Célula Pequeña (CPCP):** «Tumores neuroendocrinos poco diferenciados de alto potencial de malignidad, pérdida del patrón neuroendocrino, menor de 2-3 veces el diámetro de un linfocito, con marcada maleabilidad nuclear hacia forma en huso o grano de avena (*Oat cell*)».

En el mismo libro de la OMS, Travis, W.D. y col. presentan un esquema que recoge el espectro de proliferaciones neuroendocrinas, incluyendo la hiperplasia de células neuroendocrinas con fibrosis y/o inflamación, la hiperplasia de células neuroendocrinas adyacente a tumores carcinoides, la hiperplasia de células neuroendocrinas idiopática difusa y los “tumorlets”. Estos últimos son morfológicamente idénticos a los carcinoides típicos, salvo en el tamaño, siendo los tumorlets menores de 5 mm³⁸.

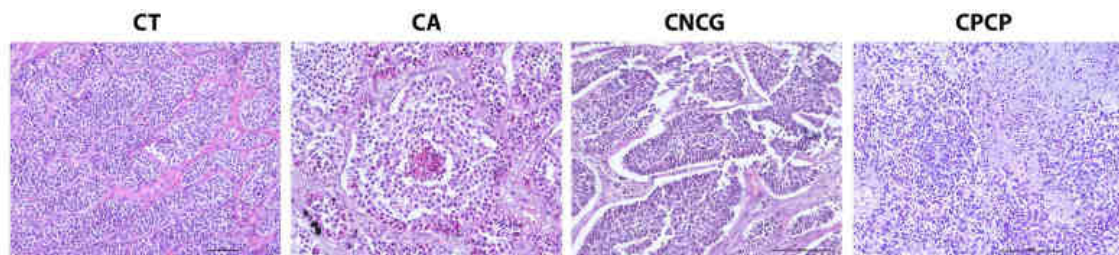


Figura 3: Subtipos de TNE de pulmón

Tabla 3: Criterios de la OMS para la clasificación de TNE Pulmonares						
Tipo Tumoral	Patrón neuroendocrino	Tamaño celular	Citoplasma	Pleomorfismo nuclear	Mitosis (x10 CGA)	Necrosis
CT	+	Grande	Abundante	-	<2	-
CA	+	Grande	Abundante	-/+	2-10	+ (focal)
CNCG	+/-	Grande	Abundante	+	>10	+
CPCP	-	Pequeño	Escaso	+	>10	+

1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES NEUROENDOCRINOS

La obtención de datos sobre incidencia para TNEs ha sido siempre difícil debido a la baja frecuencia de estas neoplasias, su largo curso clínico, diagnóstico poco específico,

escasos registros de tumores y como ya se ha explicado anteriormente, la falta de una clasificación clara y objetiva para dichos tumores. En el registro norteamericano del programa SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) se recogen datos desde 1973 y los datos existentes para la población caucásica muestran una incidencia de 2,5-5 nuevos casos por 100.000 habitantes al año (Carcinoides GI y Broncopulmonares), representando el 0,5% del total de tumores³⁹ (Figura A). Aunque se consideran tumores de baja frecuencia su incidencia ha aumentado notablemente en los últimos 30 años (Figura 4B). Además, la prevalencia de estos tumores es relativamente alta debido a la elevada supervivencia que puede llegar a ser del 35% al 60% a 5 años para pacientes con enfermedad avanzada. Como ya se expuso anteriormente los TNE más frecuentes son los “carcinoides clásicos” que pueden aparecer en diversas localizaciones corporales, siendo los pulmonares lo más frecuentes (31% del total de TNE), aunque la mayoría de las lesiones están localizadas en el tracto GI (66%), siendo los sitios predominantes por orden decreciente, intestino delgado, recto, apéndice, colon y estómago (Figura 4A).

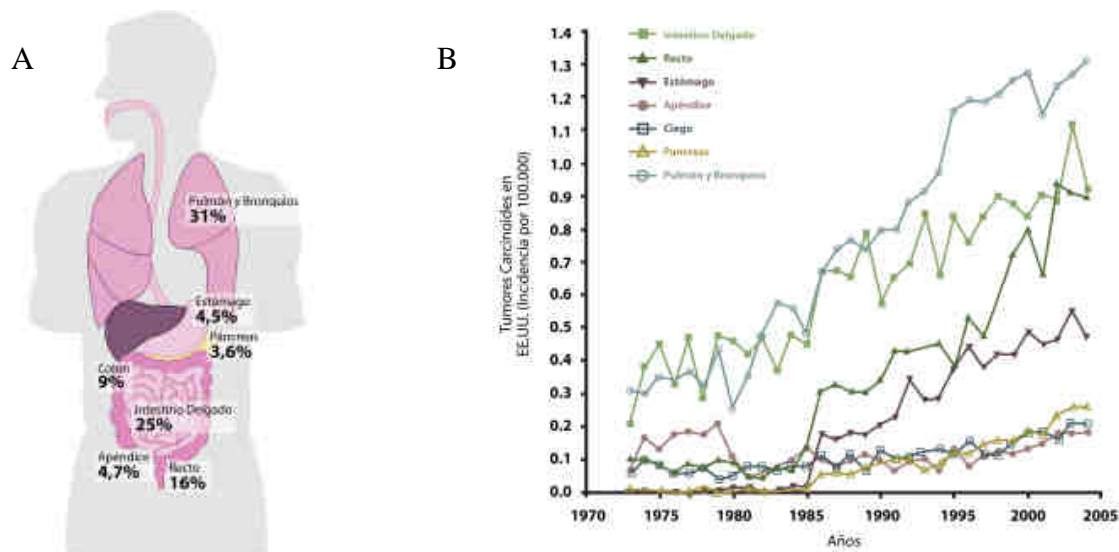


Figura 4: A: Distribución de 20.436 carcinoides registrados en la base de datos SEER entre 1973-2005. La mayoría corresponden a lesiones localizadas en el tracto digestivo (66%) y los más frecuentes localizados en el sistema broncopulmonar (31%). B: Incremento en la incidencia de tumores carcinoides en la población de EEUU en los últimos 30 años [Carcinoides: apéndice (250%), ciego (350%), broncopulmonares y de intestino delgado (420-460%), recto (900%) y estómago (1130%)] Base de datos NCI SEER.

1.4.1. Gastroenteropancreáticos

De los datos del registro SEER, entre 1973 hasta el año 2002, se pudo conocer que el 2,2% de un total de 3.122.042 tumores fueron TNE. Resulta notable que los datos

de incidencia según el registro norteamericano han aumentado en las últimas tres décadas, aunque en parte este incremento se debe posiblemente a un aumento en la concienciación de los clínicos así como en los avances en las técnicas de diagnóstico⁴⁰, siendo de 1,09/100.000 en 1973 a 5,25/100.000 en 2004, datos correspondientes a tumores en todas las localizaciones y en diferentes estadios de la enfermedad. Las cifras publicadas según el registro de tumores británicos y el registro norteamericano SEER muestran una tasa de incidencia ajustada de 0,7/100.000 a 4,2/100.000 habitantes/año respectivamente^{41, 42}. Además, los TNEGEP son los segundos tumores de mayor prevalencia derivados del tracto digestivo tras el carcinoma colorrectal. En la siguiente Tabla 4 se resumen los datos existentes para TNEGEP por localización:

Tabla 4: Epidemiología y supervivencia de TNEGEP				
	Incidencia x 100000/año (% del total de TNEGI)	Media de edad	Ratio (hombres:mujeres)	Supervivencia (A 5 años)
TNE Estómago ⁴³ ⁴⁴⁻⁴⁶	0,002-0,1 (4,5-7%)	50-60 años	1:2	TNEBD: 64% para enfermedad localizada
TNE Duodeno- Yeyuno proximal ^{47 44-46}	0,21 y 0,04 resp. (6-8 y 1% resp.)	50-60 años	1,5:1	72% regional, 50% metastásica.
TNE Yeyuno distal-Íleon ^{47 44-46}	0,41 y 3,2 resp. (5-8 y 25% resp.)	60-70 años	1:1	CNPD 10 meses
TNE Apéndice ⁴⁸	0,15 (17%)	32-43 años	2:1	100%
TNE Colon y Recto ^{49 44 50}	0,11-0,76 (30 %)	60-70 años	1:0,6	TNEBD 72% enfermedad localizada 39% regional 5,5% metastásica CNPD 10 meses
TNE Páncreas ⁴⁴	0,2-2 (3,6-4,5%)	30-60 años	1:1,15	60-100%: enfermedad localizada 40% regional 25% metastásica

Desde 2005 existe en España el Registro Español de Tumores Endocrinos Gastroenteropancreáticos (RGETNE) creado por el Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos (GETNE). Dicho grupo está compuesto por 46 equipos tanto del ámbito universitario como hospitalario, distribuido por todo el territorio nacional. Durante estos años estos equipos han proporcionado al registro nacional información necesaria, considerando características demográficas, procedimientos en el diagnóstico, intervenciones terapéuticas y datos de supervivencias de pacientes con TNEGEP⁵¹.

El Hospital Universitario Central de Asturias registró hasta Junio de 2010 un total de 133 casos, que hace que se convierta en el segundo hospital de ámbito nacional, después de Hospital Vall D'Hebron de Barcelona con 147 casos, en número de casos registrados en dicho registro nacional.

Del estudio publicado recientemente por el grupo GETNE, desde Junio 2001 hasta Diciembre de 2008 se registraron 907 tumores de 887 pacientes con edad media de 58 años. La mayoría correspondieron a carcinoides gastrointestinales (55%), seguido por tumores pancreáticos no funcionales (20%) y tumores neuroendocrinos metastásicos de primario desconocido (9%). La mayoría de los tumores funcionales, consistieron en carcinoides entéricos (10%), insulinomas (8%) y gastrinomas (4%). Los glucagonomas, VIPomas o somatostatínomas representaron a <2% de la población.

De esta reciente revisión se pudieron sacar las siguientes conclusiones: en el momento del diagnóstico el 44% de los pacientes presentaban enfermedad extendida comparada con el de otras series como la SEER, que era del 21%. Asimismo, existía una fuerte correlación entre ambos registros, respecto a la localización del tumor primario y el estadio de la enfermedad. Sin embargo, existen algunas discrepancias. Según la base de RGETNE, la localización de tumor primario en enfermedad avanzada en orden decreciente de frecuencia era: yeyuno/íleon (65%), colon (48%) y recto (40%) mientras que en el registro SEER era páncreas (64%), ciego/colon (44%/32%) y yeyuno/íleon (30%). El tipo tumoral también se asociaba con el estadio: una alta proporción de VIPomas (71%), tumores pancreáticos no funcionales (44%) y carcinoides entéricos (41%), presentaron enfermedad en estadio IV, comparado con gastrinomas, insulinomas o glucagonomas (22%, 15% y 15% respectivamente). Como era de esperar, tumores pobremente diferenciados y los bien diferenciados de estadio IV presentaron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (67% y 38%, respectivamente).

1.4.2. Pulmonares

La epidemiología de los TNE pulmonares también se ha incrementado mucho en las últimas décadas gracias al diagnóstico precoz por imagen, aunque una gran mayoría son hallados accidentalmente. Del registro de SEER, los carcinoides corresponden al 1,2% de un total 463.338 tumores primarios de pulmón y su incidencia en EEUU se ha incrementado rápidamente los últimos 30 años (6% por año)^{52, 53} En la tabla 5 se recogen los datos epidemiológicos actuales de cada subtipo tumoral.

Subtipo histológico	Incidencia relativa (% del total de Tumores Pulmonares)	Media de edad	Ratio (hombres:mujeres)	Supervivencias (A los 5 años, aprox.)
CT	1-2%	55 años	1:1	100% ⁵⁴
CA	0,2%	30-50 años	1:1	60-70% ⁵⁵
CNCG	3%	60 años	3:1	25% ⁵⁶
CPCP	20%	70 años	5:1	<10% ⁵⁷

1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS TUMORES NEUROENDOCRINOS

1.5.1. Gastroenteropancreáticos

Los TNE constituyen un conjunto de enfermedades neoplásicas que, si bien comparten una serie de características histopatológicas comunes, son de una gran heterogeneidad clínica, bioquímica y biológica. En primer lugar porque se originan en células neuroendocrinas de amplia distribución anatómica, incluyendo células de la cresta neural (ganglioneuroma, neuroblastoma, paraganglioma), glándulas endocrinas (adenoma de hipófisis, feocromocitoma), islotes endocrinos pancreáticos, tiroideos o cutáneos, y células del sistema endocrino difuso (gastrointestinal, broncopulmonar, tímico, urogenital).

En segundo lugar, los síntomas o manifestaciones clínicas causadas por los TNEGEP son fundamentalmente debidos a los efectos mecánicos de su presencia, crecimiento y metástasis, así como el efecto que produce la sobreproducción endocrina, que al pasar a la circulación sanguínea producen síndromes muy variados (serotonina -

síndrome carcinoide, gastrina - síndrome de Zollinger-Ellison, VIP - síndrome de Verner-Morrison, etc).

Los tumores neuroendocrinos son generalmente de crecimiento lento y esta característica hace que se detecte el tumor después de 4-6 años. Los síntomas clínicos se caracterizan por ser muy generales, variables e inespecíficos del tipo tumoral, entre los que destaca ardor gástrico, dispepsia, dolor abdominal, diarrea, debilidad muscular, pérdida o ganancia de peso, *flushing*, sarpullido e ictericia entre otros^{58, 59}. La mayoría de los pacientes que presentan TNE de Apéndice, cursan con clínica de apendicitis y son descubiertos accidentalmente durante intervenciones quirúrgicas de apendicectomías⁶⁰.

Aproximadamente el 5-10% de los TNEGEP presentan un componente hereditario. En este caso, la presencia de estos tumores se debe a mutaciones génicas en genes supresores de tumores que dan nombre a un tipo de síndrome específico. Entre estos síndromes destacan: la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (MEN1), la Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), cuyas características clinicopatológicas y genéticas se resumen a continuación⁶¹⁻⁶³ (Tabla 6).

Tabla 6: Síndromes genéticos relacionados con la presencia de TNEs.				
Gen-Síndrome	MEN1	NF1	VHL	TSC
Herencia	Autosómico dominante	Autosómico dominante	Autosómico dominante	Autosómico dominante
Localización cromosómica	11q13	17q11.2	3p25	TSC1 9q34 TSC2 16p13.3
Estructura génica	10 exones (9Kb)	>50 exones (300Kb)	3 exones	TSC1 23 exones TSC2 42 exones
Proteína	Menina (610 Aa.)	Neurofibromina (2818 Aa.)	pVHL30 (28 KDa) pVHL19 (18 KDa)	TSC1 Hamartina (140KDa) TSC2 Tuberina (200 KDa)
Prevalencia	1:20000-1:40000	1:2000-1:5000	1:36000	1:10000
Penetrancia	>95% (50 años)	100% (en niños)	>95% (60 años)	100%
Localización tumoral	Duodeno (gastrinomas) Páncreas (No funcionantes, insulinomas, microadenomas)	Duodeno (somastotatinomas) Páncreas (somastotatinomas e insulínomas)	Páncreas (No funcionantes de tipo célula clara)	Páncreas (insulinomas y somastotatinomas)

1.5.2. Pulmonares

A diferencia de TNEGEP, los carcinoides de pulmón rara vez se asocian con hipersecreción o síndrome carcinoide, el cual ocurre en menos del 2% de pacientes con esta neoplasia, en comparación con el 10% de pacientes con TNEGEP⁶⁴. Al igual que TNEGEP, los síntomas son similares, debidos en gran parte a la secreción de serotonina y otros productos vasoactivos (diarrea, *flushing*, sibilancia y cardiopatía). Solo los carcinoides surgen en el 5% de los pacientes con Neoplasia Endocrina Múltiple (MEN1)⁶⁵

Entre los síntomas generales relacionados con la presencia del tumor cabe destacar la tos, hemoptisis y neumonía, generados por la obstrucción luminal y ulceración del tumor. En varias series de CNCG se vio que un alto porcentaje de los casos fueron asintomáticos o bien presentaron síntomas gripales, disnea y sudoración nocturna⁵⁶.

Por otro lado, la producción ectópica de hormonas y el síndrome paraneoplásico son frecuentes en CPCP, incluyendo el síndrome de la secreción inadecuada de hormona antidiurética (SIADH) y Síndrome de Cushing (por producción ectópica y secretora de ACTH). La frecuente invasión tumoral a tejidos periféricos suele provocar disfagia, ronquera y síndrome de vena cava superior⁶⁶.

1.6. ALTERACIONES GENÉTICO-MOLECULARES EN TUMORES NEUROENDOCRINOS

1.6.1. Gastroenteropancreáticos

Tres estudios, basados en análisis de microarrays CGH de DNA (CGH del inglés *comparative genomic hybridization*), marcadores de LOH (del inglés “*Loss Of Heterozygosity*”) en microsatélite y análisis de mutación génica, han revelado que el promedio de cambios genómicos (2,9) es más bajo en TNE gastrointestinales que en los de páncreas; asimismo, no hay correlación entre el número de aberraciones y el estadio tumoral⁶⁷⁻⁶⁹. En la Tabla 7 se resumen las alteraciones genéticas más frecuentes en TNEGEPs descritas en estos trabajos. En general se evaluaron: LOH en genes supresores de tumores, ganancia de función y/o amplificación de oncogenes, metilación

de promotor, inestabilidad genómica, pérdida de la regulación en el ciclo celular, así como genes implicados en reparación del DNA.

	TNEGI	TNE Pancreáticos
Deleciones cromosómicas	18 (38-88%), 9p (50%) ⁶⁸ , 11q (60%)	11q (30%), 3p (30%) ⁷⁰
Metilaciones de promotor	p16 (52%) ⁷¹ , TP53 (25%) ⁷²	p16 (9%) ⁷⁰
Mutaciones y deslocalización proteica	β-catenina (Mut 38%) ⁷³ (Des 1.9%) ⁷⁴ , APC (1,4%) ⁷³ , Cadherina-E (Desl 22%) ⁷⁴	β-catenina (Mut 24%) ⁷⁰ VHL (1-3%)
Mecanismos de tumorigénesis	Ruta CIMP (CpG island methylator phenotype)	Inestabilidad cromosómica

Con el fin de establecer dianas terapéuticas se han caracterizado varias vías de señalización. Por una parte, los TNEs se caracterizan también por ser tumores muy vascularizados. Consistente con este hecho se ha observado que tanto el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como sus receptores (VEGF-R) están sobre-expresados en un 60-84% de los TNEs tanto entéricos como pancreáticos. Otros factores proangiogénicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), también están involucrados en el desarrollo de los TNEs y su progresión^{75, 76}. Algunos autores han correlacionado la expresión del VEGF y VEGF-R con un aumento en la angiogénesis, una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis y una peor supervivencia⁷⁷. Por otra parte, también se ha descubierto la sobre-expresión de receptores oncogénicos diana como el EGFR^{78, 79} y la sobre-expresión del IGFR^{80, 81}.

1.6.2. Pulmonares

A nivel genético, el tipo de alteración más frecuente es la pérdida alélica (detectable como LOH), cuya frecuencia aumenta con el grado histológico. La tabla 8 muestra la información referente a las pérdidas alélicas encontradas para diversos loci.

Tabla 8: Alteraciones genéticas descritas para los TNPs					
LOH	Gen candidato	CT^{82, 83}	CA^{82, 83}	CNCG⁸²⁻⁸⁴	CPCP^{82, 83, 82-84}
3p	-	40%	73%	80%	85%
Inestabilidad microsátélites 3p	-	-	-	60%	100%
17p13	p53	10%	45%	72%	90%
11q13	MEN	44%	50%	46%	86%
5q21	APC/MCC	0%	25%	46%	86%

Se ha descrito una correlación entre LOH y mutaciones en p53 con la severidad del tipo tumoral y LOH en 5q21 (genes APC/MCC) con una baja supervivencia en estos pacientes ⁸².

Se ha observado que los CTs sobreexpresan la proteína proapoptótica Bax y no expresan la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo cual indicaría que la respuesta apoptótica podría estar mantenida en los CTs, lo contrario de lo que ocurre en los CNCGs y CPCPs ⁸⁵.

1.7. PROGRESIÓN TUMORAL: TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMA, INVASIÓN Y METASTASIS

El fenotipo celular es el resultado de un equilibrio dinámico entre la maquinaria de transcripción-traducción en la célula y su entorno, que controla la proliferación y diferenciación celular propias de cada órgano o tejido. En las células tumorales este equilibrio se altera como consecuencia del acúmulo de múltiples y sucesivas alteraciones genéticas, llevando a una pérdida de la homeostasis, así como de las funciones celulares y fisiológicas. Este desequilibrio, en muchos casos, es la causa de la malignización celular, condición caracterizada, entre otras, por las siguientes propiedades: autosuficiencia proliferativa, insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, capacidad de evasión de los programas de muerte celular, potencial replicativo ilimitado, capacidad de inducir angiogénesis, tendencia a invadir tejidos adyacentes y a distancia, inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo energético, relación con la respuesta inflamatoria y capacidad para evadir al sistema inmune ^{86, 87} (Figura 5).

Adicionalmente, y como consecuencia, al menos en parte, de la inestabilidad genómica, a lo largo de la progresión tumoral se genera un conjunto heterogéneo de poblaciones celulares. Algunas de ellas serán capaces de colonizar un órgano o tejido diferente al de origen del tumor primario. Este proceso denominado metástasis, es la causa principal de muerte por cáncer y del fracaso de muchas terapias⁸⁸.

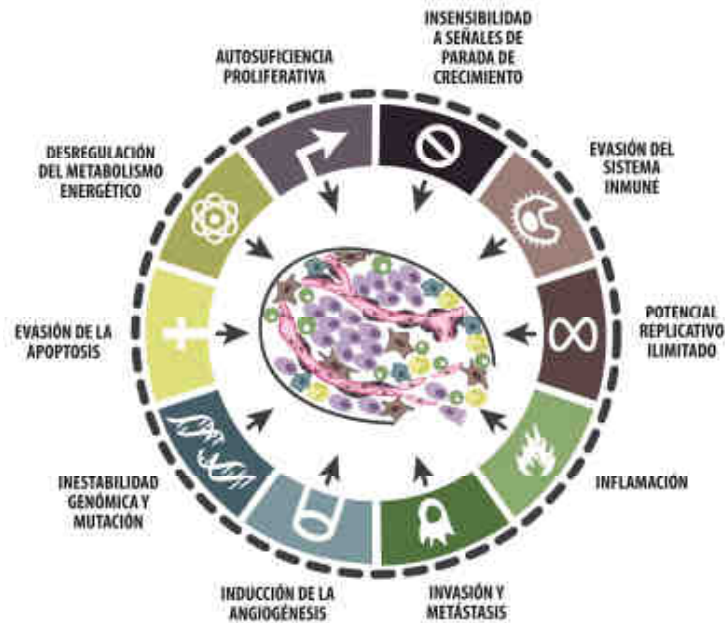


Figura 5: Capacidades adquiridas por las células tumorales (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011)

La progresión tumoral se puede definir como un proceso multietapa, que tiene lugar desde que se forma el tumor primario hasta que las células originan una lesión metastásica⁸⁶. Este proceso está bien establecido para el desarrollo de los carcinomas, que constituyen el 90% de tumores de origen epitelial⁸⁹. La pérdida de organización de los epitelios no depende sólo de las alteraciones sufridas por las células tumorales sino también de la desorganización de la matriz extracelular (MEC) que las envuelve y las sostiene, estableciéndose una estrecha comunicación entre ambos, imprescindible en el proceso de progresión tumoral⁹⁰.

En la figura 6 se muestra un modelo simplificado de las etapas discretas de la metástasis. En cada una de ellas se producen cambios en la expresión génica que confieren a la célula funciones concretas. Las primeras etapas destacan por ser procesos de alta eficiencia con la formación del tumor primario y de un fenotipo motil. Las últimas etapas son procesos de baja eficiencia, tanto la diseminación hacia órganos distantes como el crecimiento de tumores secundarios.

Brevemente, las etapas son:

1. Formación del tumor primario. En la mayoría de los tumores epiteliales, la evolución hacia la malignización (de adenoma a carcinoma infiltrante) es producto de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que van asociados con cambios histopatológicos.
2. En estados avanzados tiene lugar la rotura de la lámina basal, liberación de las células del tumor primario e invasión a través del estroma, lo cual implica una interacción con la matriz extracelular y con otras células tipo fibroblastos, células endoteliales, etc.
3. Penetración en los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación) permitiendo su transporte hasta órganos distantes.
4. Diseminación: Las células tumorales han de sobrevivir al ataque del sistema inmunológico, así como a las turbulencias de la propia circulación.
5. Extravasación y formación de micrometástasis y tumores secundarios en órganos distantes.

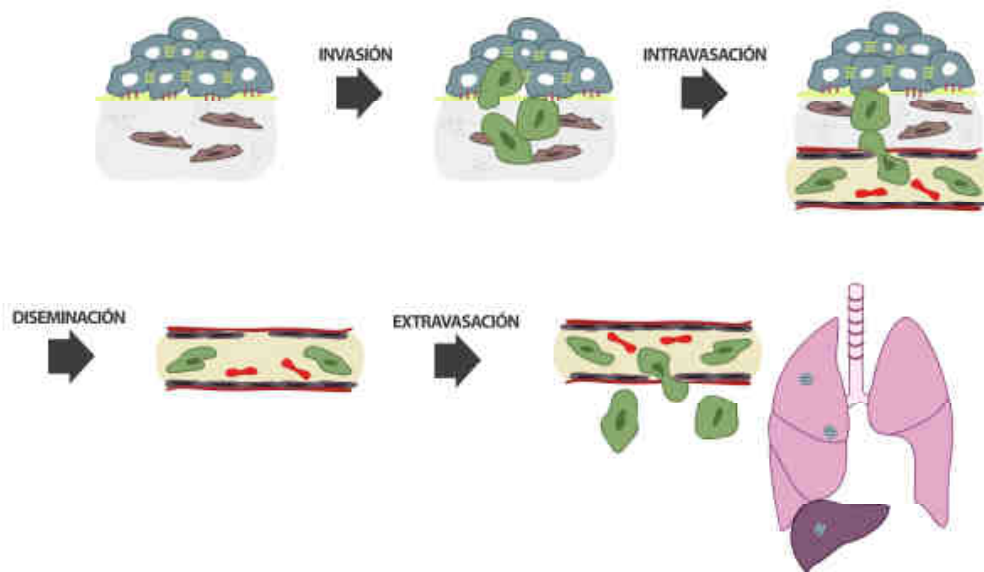


Figura 6: Etapas de la metástasis: En un tumor primario, algunas de las células tumorales pueden invadir provocando ruptura de ésta, pudiendo alcanzar los vasos sanguíneos y linfáticos (intravasación), permitiendo su transporte pasivo a otros órganos. Al llegar a su destino, las células tumorales pueden extravasarse y permanecer solitarias (micrometástasis) o bien formar un nuevo tumor (tumor secundario). (Modificado de Peinado H y col. 2007)

1.7.1. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA: UN PROCESO COMÚN EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y EN LA CARCINOGENÉISIS.

El proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM), descrito en 1968 por Elisabeth Hay, como su nombre indica, hace referencia al cambio fenotípico por el que las células con características epiteliales adquieren propiedades de células mesenquimales, entre ellas la movilidad y capacidad invasiva.

Se trata de un proceso crucial en estadios temprano del desarrollo embrionario y también constituye la primera fase de la progresión tumoral y cascada metastásica. Durante este proceso, las células epiteliales pierden cohesión intercelular, experimentan una reorganización del citoesqueleto, con pérdida de la polaridad ápico-basal, de manera que cambian a un fenotipo fibroblástico, expresan marcadores mesenquimales y adquieren capacidad migratoria y de invasión de la MEC⁹¹⁻⁹³.

El proceso inverso a la Transición Epitelio-Mesénquima es la Transición Mesénquima-Epitelio (TME) y tiene lugar en tejidos de destino u órgano colonizado⁹⁴⁻⁹⁶.

Ambos procesos proporcionan una plasticidad dinámica indispensable en:

- Procesos fisiológicos
 - Estadios específicos del desarrollo embrionario temprano como son:
 - Implantación embrionaria y endodermo parietal⁹⁷
 - Invaginación del ectodermo a partir de la línea primitiva o gastrulación para la formación del mesodermo⁹⁷
 - Delaminación-Emigración de las células de la cresta neural^{92, 98}
 - Morfogénesis embrionaria como:
 - Palatogénesis⁹⁹
 - Generación de cojinetes cardíacos (precursores de las válvulas cardíacas)¹⁰⁰
 - Nefrogénesis¹⁰¹ y miogénesis¹⁰²
 - Respuesta a daños específicos en el organismo adulto:
 - Reparación de heridas
- Procesos patológicos
 - Fibrosis de órganos: renal, pulmonar, etc..⁹⁵
 - Progresión tumoral: invasión y metástasis^{95, 103-106}

Los cambios fenotípicos que experimentan las células tumorales en el proceso de invasión presentan un gran paralelismo con los del desarrollo embrionario. En ambas situaciones, algunas subpoblaciones de células epiteliales pierden su sistema de adhesión célula-célula y célula-MEC, para abandonar su entorno y alcanzar sitios distantes (metástasis en la progresión tumoral), o bien sufrir diferenciación a distintos tipos celulares (desarrollo embrionario)^{95, 107}.

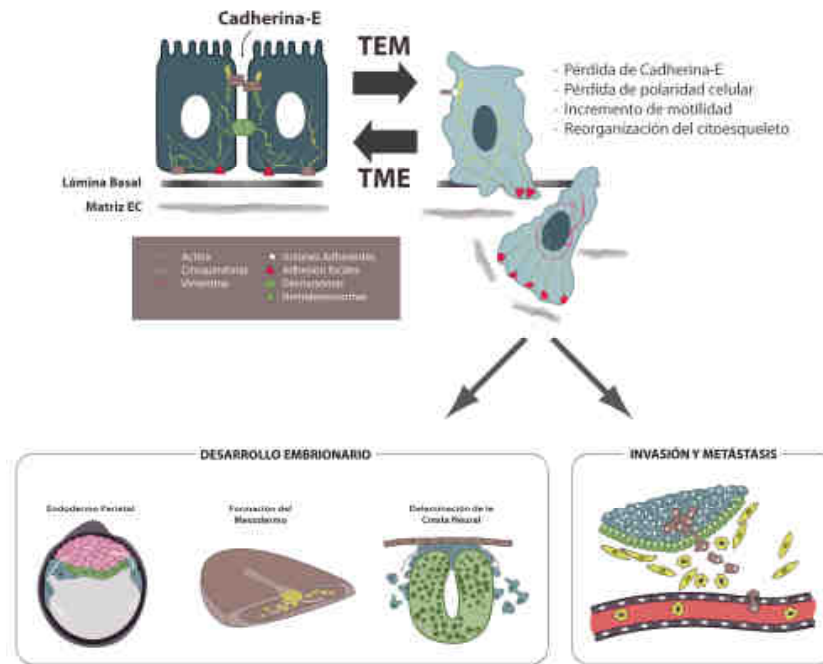


Figura 7: Implicación del proceso TEM, común en desarrollo embrionario, así como en la invasión tumoral y metástasis. (Adaptado de Peinado y col. 2007 y Thiery y col. 2009)

Recientes revisiones han propuesto clasificar el proceso de TEM en tres subtipos diferentes, en función del contexto biológico y de las consecuencias funcionales, en un intento de reflejar mejor las propiedades distintivas de TEM en el desarrollo. Estos 3 tipos son: TEM tipo I, propia del desarrollo; Tipo II, en procesos de fibrosis y cicatrización de heridas y tipo III, en la carcinogénesis^{108, 109}.

1.7.1.1. Inducción y regulación de la Transición Epitelio-Mesénquima

Desde hace más de una década, numerosos estudios *in vitro* han identificado diversas señales extracelulares que pueden activar la TEM. Las vías de señalización intracelular activadas convergen en sus etapas finales, induciendo el cambio fenotípico.

Asimismo, se ha documentado la existencia de una comunicación entre las vías de transducción que inducen e inhiben dicho proceso (Figura 8).

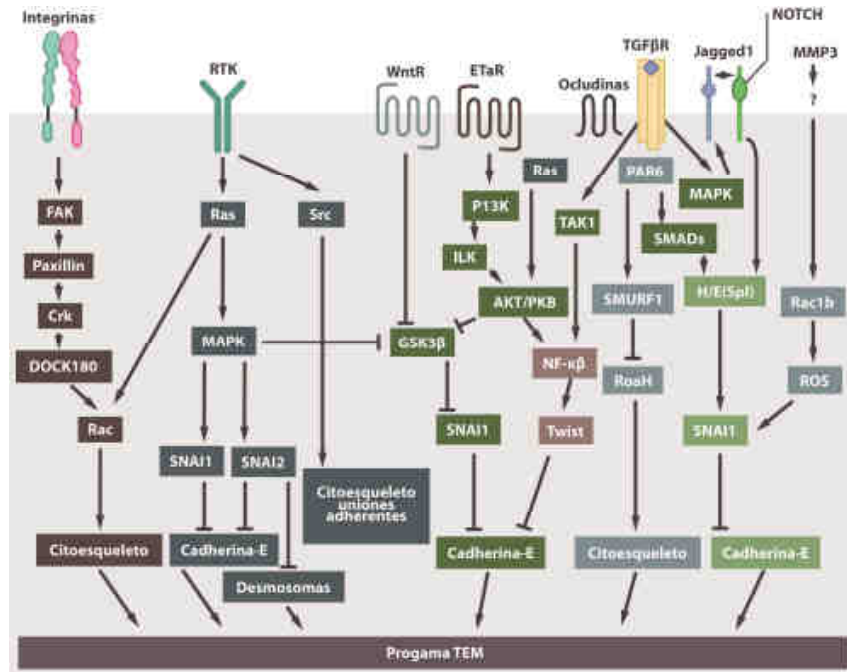


Figura 8: Vías de señalización que son activadas por reguladores de la TEM así como una representación parcial de las relaciones entre ellas. ETaR (Receptor de endotelina A); FAK (Quinasa de adhesión focal); GSK3 β (Glucógeno Sintasa Quinasa 3 β); H / E (Spl), amplificador de Split; ILK (Quinasa unida a integrina), MAPK (Quinasa activada por mitógenos); NF- κ B (Factor Nuclear κ B); Par6 (Proteína 6 defectiva en la partición), PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinasa); PKB (Quinasa proteica B); ROS (Especies reactivas derivadas del oxígeno); TAK1 (Quinasa 1 activada por TGF- β); TGF β R (Receptor de TGF- β); WntR (Receptor de Wnt) (Adaptado de Thiery y col. 2006).

Entre las vías de señalización más relevantes en TEM cabe destacar:

- **Vía Receptor Tyrosin kinasas (RTK):** SF / HGF (del inglés *Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor*), FGF (del inglés *Fibroblast Growth Factor*), EGF (del inglés *Epidermal Growth Factor*) y PDGF (del inglés *Platelet-derived Growth Factor*). Todos corresponden a factores de crecimiento solubles que se unen a RTK específicos de membrana. Dichos receptores, presentan un dominio quinasa intracelular que se activa tras la unión del ligando. Tras la fosforilación, se reclutan diferentes factores que activan pequeñas proteínas de unión a GTP como Ras, Rho y Rac. Dichas GTPasas activan la vía de MAPK y PI3K y culminan con la activación de la transcripción de Snail1 y la consiguiente desregulación de cadherina-E¹¹⁰. La activación de los RTKs, puede activar otras vías independientes de la vía Ras / MAPK, como la de la familia de tirosina

quinasas Src, cuya actividad catalítica es necesaria para romper los contactos célula-célula dependientes de cadherinas¹¹¹.

- **Vía TGF- β** (del inglés *Transforming Growth Factor β*): Es la vía de TEM por excelencia. Los miembros de la familia de factores de crecimiento TGF- β , pueden iniciar y mantener la TEM en una variedad de sistemas biológicos¹¹². Ya en los años 90, se establecieron como mediadores de la progresión tumoral¹¹³. Los factores TGF- β se unen al receptor Ser / Thr quinasa tipo II que, tras la unión al ligando, fosforila el receptor Ser / Thr quinasa tipo I, que finalmente fosforila a las proteínas citoplasmáticas Smad2 y Smad3. Dichas proteínas forman un complejo con Smad4 y se translocan al núcleo donde se unirán a la cromatina conjuntamente con otros factores de transcripción, regulando la expresión de ciertos genes. Las proteínas Smad pueden actuar tanto como represores transcripcionales (inhiben la expresión de los genes Id, conocidos inhibidores de la TEM) como de activadores transcripcionales, activando la expresión de Zeb1 y LEF1, Twist, Snail1 y Snail2¹¹⁴.

Alternativamente a la activación de las proteínas Smad, los receptores TGF- β pueden activar MAPK, PI3K-Akt, Rho y Scr e inducir las respuestas TEM, desorganizando directamente las uniones célula-célula y activando un programa genómico crítico para la generación de células con fenotipo mesenquimal¹¹⁵. De éstas cabe destacar la dependiente de la vía PI3K-Akt, donde la activación de Akt, una quinasa que desencadena toda la cascada de señalización a través de PI3K y de mTOR, culmina con la activación de Snail1 y Snail2 y la consiguiente desregulación de cadherina-E^{116, 117}. Por otro lado, Akt es capaz de fosforilar a GSK-3 β , una quinasa que tras unirse y fosforilar a Snail1, provoca su retención en el citoplasma y consiguiente ubiquitinización y degradación via proteasoma. La fosforilación de GSK-3 β por Akt, provoca la degradación de ésta, y por tanto la acumulación nuclear de Snail y la consiguiente represión de cadherina-E, desencadenando el proceso de EMT^{118, 119}.

- **Vía Wnt**: La interacción de las proteínas Wnt con los receptores transmembrana Frizzled provoca un bloqueo del complejo Axina-APC-GSK3 β y la consiguiente estabilización de la β -catenina. La β -catenina se transloca al núcleo donde interactúa con los coactivadores TCF/LEF, haciendo que se active la transcripción de genes implicados en la TEM (por ejemplo, se ha descrito que puede activarse la transcripción de Snail2¹²⁰ y Twist¹²¹).

- **Vía ILK:** (del inglés *Integrin Linked Kinase*): Es una Ser-Thr-quinasa expresada en células de mamífero, que interacciona con el dominio citoplasmático de las integrinas. Participa en procesos de proliferación, migración, angiogénesis y supervivencia celular, transduciendo señales desde la MEC. La actividad quinasa de ILK se activa rápidamente por la unión de las integrinas en la MEC y es dependiente de PI3K. ILK fosforila GSK3 β y la inactiva, promoviendo la estabilización de la β -catenina y su translocación a núcleo. ILK induce la expresión de Snail1¹²² y Snail2¹²³ inhibiendo la expresión de MTA3 (del inglés *Metastasis-associated protein 3*), proteína que forma parte del complejo inhibidor de la transcripción de Snail1¹²⁴.
- **Vía Notch:** La vía Notch se activa cuando interaccionan ligando (en mamíferos son Delta-like y Jagged) y receptor (en mamíferos receptores Notch1-4) de dos células vecinas. El receptor se proteoliza y libera un fragmento (IC) que se transloca al núcleo. Éste se une a factores de transcripción de la familia CSL. Finalmente estos factores de transcripción tales como CBF-1, se activan y comienzan la activación y regulación transcripcional de otros factores de transcripción de la familia bHLH (HRT/HERP/Hey), familia de proteínas HES, IL-4, p21 entre otros¹²⁵.

Notch regula directamente la expresión de Snail1 mediante la unión del dominio IC de Notch al promotor de Snail1, y en segundo lugar, Notch potencia HIF1 α por el reclutamiento del promotor la lisil oxidasa (LOX), y eleva la hipoxia inducida por la regulación positiva de LOX, que estabiliza a Snail1 y la protege de la degradación.¹²⁶ En este sentido hay que destacar que se ha demostrado que una diana directa de HIF1 α es Twist, al cual se le asignado un papel clave en situaciones de hipoxia en el microentorno tumoral¹²⁷.

1.7.1.2. Pérdida de la expresión y/o función de la Cadherina-E en la Transición Epitelio-Mesénquima

Las células epiteliales de un organismo sano están íntimamente ligadas entre sí mediante uniones intercelulares (uniones oclusivas, uniones adherentes y desmosomas) que mantienen la integridad de los epitelios^{128 129}.

Las cadherinas, descubiertas en 1986 por M. Takeichi, constituyen una superfamilia de glicoproteínas transmembranales dependientes de calcio que median en las interacciones homotípicas entre células adyacentes^{130 131}. Además, las cadherinas intervienen en procesos más complejos como son el desarrollo de la polaridad celular, la formación de tejidos embrionarios y el control de la homeostasis tisular^{132 133}.

La cadherina-E media las uniones adherentes de las células epiteliales a través de la interacción de las regiones extracelulares de dos moléculas pertenecientes a células adyacentes. Su dominio citosólico conecta con los microfilamentos de actina del citoesqueleto de forma indirecta, a través de las cateninas, proteínas de estructura y función muy conservadas entre organismos vertebrados e invertebrados. Existen 3 cateninas diferentes: α , β y γ (plakoglobina), que difieren entre ellas por la localización y por el grado de asociación con la cadherina-E. Así, la catenina- β interacciona con la cadherina-E en las uniones adherentes, mientras que la γ -catenina participa preferentemente en los desmosomas^{128 132}. Sin embargo, las dos proteínas sirven de nexo entre la cadherina-E y la catenina α , que es la responsable de la interacción con el citoesqueleto de actina. De esta manera, las células epiteliales que expresan cadherina-E junto con el resto de componentes funcionales aseguran el anclaje al citoesqueleto, hecho indispensable para el mantenimiento en la estabilidad de las uniones intercelulares y la integridad de los tejidos^{134 135}.

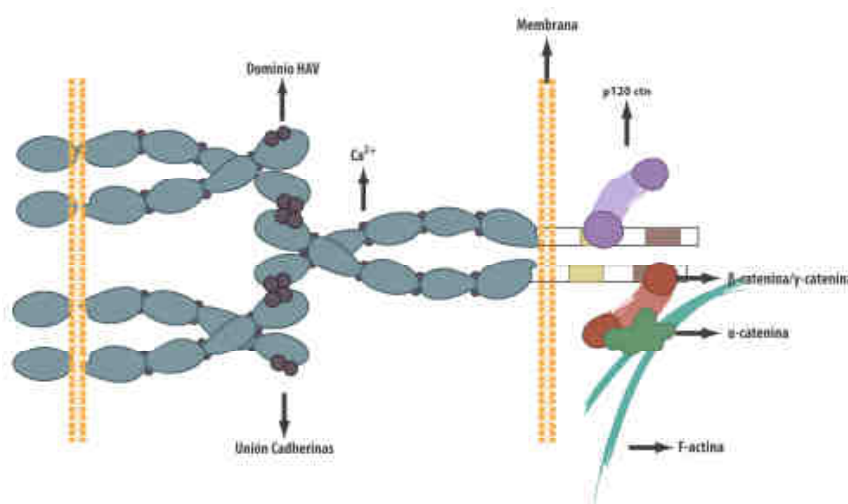


Figura 9: Complejo de adhesión cadherina-E-cateninas (Modificado de Paredes y col. 2007²⁵³)

Estudios *in vitro* demuestran que la adición de anticuerpos anti-cadherina-E a cultivos de células epiteliales puede truncar las uniones intercelulares e inducir un fenotipo mesenquimal¹³⁶. Se ha establecido una correlación inversa entre la pérdida de

cadherina-E y el fenotipo epitelial^{137 89 138}. Otros estudios describen una correlación entre la ausencia de función de la cadherina-E y la adquisición de la capacidad de invasión durante la TEM tanto en determinadas etapas del desarrollo embrionario (gastrulación de organismos como *Drosophila*¹³⁹, pollo¹⁴⁰ y ratón¹⁴¹) como en la progresión tumoral, tal como se observa en los frentes invasivos en la transición de papilomas a carcinomas de piel de ratón. Por ello se considera al gen de cadherina-E como un gen supresor de invasión y su pérdida funcional es esencial para la TEM^{142, 143}.

La expresión y funcionalidad de la cadherina-E se mantiene en la mayoría de los carcinomas diferenciados de piel, cabeza y cuello, mama, pulmón, hígado, colon y próstata, mientras que en los carcinomas más agresivos se detecta pérdida de la expresión, existiendo una correlación inversa de la expresión de cadherina-E y el grado de malignidad^{137 89}.

1.7.2. MECANISMOS RESPONSABLES DE LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN Y/O FUNCIÓN DE LA CADHERINA-E: REPRESORES TRANSCRIPSIONALES

En los tumores humanos, las alteraciones de cadherina-E a nivel genético son poco frecuentes, habiéndose descrito en algunos tipos (carcinomas lobulillar de mama¹⁴⁴ y carcinomas gástricos difusos¹⁴⁵) mutaciones somáticas y pérdida de heterocigosidad del locus de cadherina-E, con la consiguiente pérdida de expresión y/o función proteica.

La mayoría de los carcinomas que no presentan expresión de cadherina-E conservan el locus de cadherina-E intacto. Esto hace pensar en mecanismos transcripcionales que podrían estar jugando un papel importante en la regulación de la expresión de la cadherina-E. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de las modificaciones epigenéticas, como la hipermetilación de la región promotora del gen de cadherina-E, que se ha asociado a la pérdida de su expresión en diferentes carcinomas humanos¹⁴⁶. Otras modificaciones epigenéticas, como la acetilación/desacetilación de histonas podrían colaborar en el mismo sentido¹⁴⁷.

En la mayoría de los casos la regulación de la cadherina-E está mediada por represión transcripcional. Existen estudios que han demostrado que la región promotora contiene los elementos indispensables para dirigir, al menos en parte, la transcripción del gen en células epiteliales y para el silenciamiento en células no epiteliales de naturaleza invasiva¹⁴⁸.

Por otra parte, esta región promotora contiene elementos palindrómicos compuesto por tres “cajas E” capaces de unir diversos represores, comúnmente expresados en células invasivas y en las que la transcripción del gen está anulada¹⁴⁹. En los últimos 10 años se han caracterizado diversos factores de transcripción que realizan esta función:

- Proteínas de la familia en dedos de zinc, Snail1^{149 150} y Snail2^{151 152}
- Factores con dedos de zinc dobles δ EF1/ZEB-1 y SIP-1/ZEB-2^{153 154}
- Factores de transcripción *basic helix-loop-helix* (bHLH) E12/E47¹⁵⁵ y Twist¹⁵⁶

Aún no se conoce bien el papel específico de cada factor ni su participación en función del contexto celular. Se maneja la hipótesis de que en las primeras fases de la TEM, la represión inicial de la cadherina-E sería llevada a cabo por un represor de alta afinidad a las cajas E del promotor, como Snail1, mientras que el mantenimiento de esta represión podría ser mediada por otros represores con menor afinidad de unión a las cajas E, como E47 o Snail2¹⁵¹, mientras que Twist, activado por Snail2¹⁵⁷, intervendría en el proceso de intravasación¹⁵⁶ y Foxc2 activado a su vez por los anteriores, actuaría en el mantenimiento temporal del fenotipo mesenquimal¹⁵⁸.

1.7.2.1. Represores transcripcionales de la familia Snail

La superfamilia de proteínas Snail, se caracteriza por presentar una estructura en dedos de zinc, a través de los cuales interaccionan con el DNA actuando como regulador negativo de la expresión del gen de cadherina-E. La superfamilia Snail, presente en vertebrados e invertebrados, engloba a su vez a dos familias que presentan homología en la secuencia de los dedos de zinc y la presencia de diversos motivos consenso: son las denominadas familias Snail y Scratch. Los miembros de la familia Scratch están más relacionados entre sí desde el punto de vista filogenético, a diferencia de las proteínas de la familia Snail que constituyen un grupo más heterogéneo¹⁵⁹.

Dentro de la familia Snail, se encuentra Snail1 (Snail), el primero de los descritos, en *Drosophila melanogaster*¹⁶⁰, y su homólogo Snail2 (Slug)¹⁶¹. Ambas proteínas son esenciales en procesos imprescindibles del desarrollo de vertebrados e invertebrados, como la diferenciación del mesodermo, la formación de la cresta neural, asimetría izquierda-derecha, desarrollo neuronal, apoptosis, división celular y la endorreduplicación¹⁶². Además, como ya se ha explicado, interviene en el adulto en los procesos de tumorigénesis, desencadenando la TEM^{93, 149, 150, 161}.

Los factores de transcripción de la familia Snail mantienen una organización estructural similar. La región carboxiterminal de Snail1 y Snail2 está altamente conservada y contiene de 4 a 6 dominios de dedos de zinc respectivamente. Los dedos de zinc son de los tipos C2H2 donde dos Cys e His coordinan un ión Zinc, responsables de su unión al DNA.

Hay que destacar la conservación de la función represora de las proteínas Snail en la evolución^{162, 163}. Monómeros de la proteína Snail1 y Snail2 interactúan con la secuencia consenso de las cajas E del promotor del gen de cadherina-E¹⁶⁴. En vertebrados, la actividad represora de las proteínas Snail no solo depende de los dedos de zinc, sino también del dominio SNAG (SNAIL/Gfi) situado en la región aminoterminal¹⁶⁵, con alto grado de homología en ambas proteínas. Algunas proteínas Snail, no tienen el dominio SNAG (en *Drosophila*), pero en cambio tienen un motivo específico de unión al correpresor, CtBP (del inglés *Carboxi-terminal Binding Protein*) que realizaría estas funciones. En algunos miembros de la superfamilia Snail en vertebrados también hay una secuencia consenso parcial de unión a CtBP¹⁶⁶.

Entre los mecanismos posttraduccionales implicados en la regulación de proteínas Snail destaca la regulación positiva, la importación o exportación nuclear, así como la degradación por la vía ubiquitina/proteosoma. En este sentido, destacan otras regiones importantes de la estructura primaria de la proteína, una región rica en serina (SD), fosforilable por varias quinasas y una secuencia NES (Nuclear Export Sequence). En el caso de Snail2 la región SD se diferencia de la de Snail1, en la presencia de una secuencia específica de 29 aminoácidos, conocida como dominio SLUG¹⁶⁷.

Los dominios SD y NES son responsables de la exportación nuclear de la proteína y de su estabilidad. Se cree que Snail1 entraría en el núcleo gracias a dos secuencias de importación (NLS) localizadas en el dominio N-terminal y C-terminal y ejercería su papel como represor transcripcional, uniéndose al ADN. Snail es una molécula muy lábil con una vida media de aproximadamente 25 minutos¹⁶⁷.

Entre las moléculas implicadas en la regulación negativa destaca GSK3 β , la cual fosforila el dominio SD (Ser 96, 100, 104 y 107) en dos motivos. La fosforilación en primer lugar del motivo 2, facilitaría la accesibilidad del motivo NES al sistema de exportación CRM1/exportina, que facilitaría la salida de Snail1 del núcleo al citoplasma. Una vez allí, se produciría la segunda fosforilación en el dominio 1, que sería reconocido por TrCP β y degradado vía ubiquitina/proteosoma^{118, 168}.

Snail1 también está regulado positivamente por la fosforilación de la Ser11 y 92 por las quinasas como PKA, CK2 respectivamente, y por la oxidación de Lys por LOXL2 que aumentan el reclutamiento de otros correpresores tipo LSD1 y CoREST en el dominio SNAG que intervienen en la estabilidad de la proteína en el núcleo, permitiendo la unión a las cajas E del promotor de cadherina-E¹⁶⁹⁻¹⁷³. Posteriormente Snail1 es capaz de reclutar otras enzimas remodeladoras de la cromatina y de las histonas, tales como acetiltransferasas de histonas (HATs) o desacetilasas de histonas (HDACs) para ejercer su función represora. Concretamente, recluta las desacetilasas de histonas HDAC1/2 de clase I y el correpresor Sin3A, tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁷⁴.

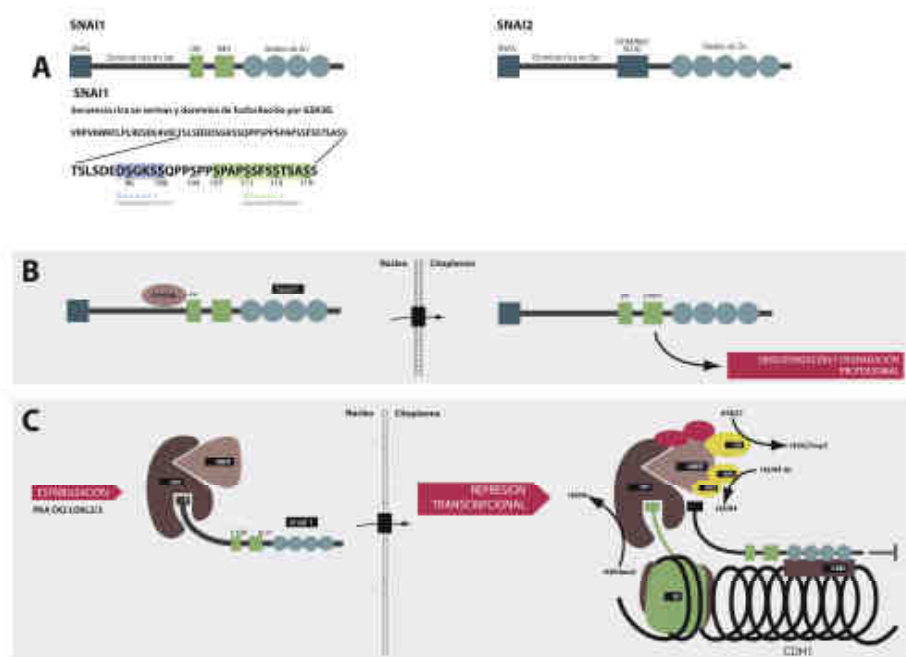


Figura 10: A: Estructura proteica de Snail1 y Snail2. B: Situación en célula epitelial: Fosforilación de Snail1 por GSK3β y exportación nuclear para su degradación. C: Situación en célula mesenquimal, estabilización de Snail1 y represión de cadherina-E. (Adaptado de Christofori G, 2010)

Además, se ha demostrado que GSK3β está regulada a su vez por algunas de las vías de señalización que controlan la expresión de Snail1 como la de PI3K/Akt y Erk/MAPK. De hecho, se ha propuesto que estas vías de señalización inhibirían GSK3β, estabilizando Snail1 y su localización nuclear permitiría la inducción de TEM. Dado que GSK3β también regula β-catenina, se podría especular que la inhibición de GSK3β por estas vías, estabilizaría tanto Snail1 como β-catenina, induciéndose la migración celular, y tumorigénesis de forma coordinada¹¹⁸.

A partir de pruebas experimentales en desarrollo embrionario, se ha propuesto un modelo según el cual Snail1 y SIP1 se consideran inductores de TEM, mientras que Snail2, E47 y δ EF1 estarían involucrados en el mantenimiento del mesodermo¹⁴⁸. En el contexto de la tumorigénesis, Snail1 sería un inductor de la migración tumoral y Snail2, E47 y δ EF1 mantendrían el fenotipo invasivo/migratorio^{148, 174}.

Tras la identificación de Snail1 como represor de cadherina-E en la tumorigénesis, se ha demostrado su implicación en varios tipos de tumores humanos. La primera prueba de la participación de Snail1 en tumores primarios humanos se obtuvo en el carcinoma ductal de mama, estudio que analizaba los diferentes mecanismos de inactivación de la cadherina-E¹⁷⁵. Posteriormente se correlacionó con el grado histológico y estado de ganglios linfáticos en carcinoma ductal y lobulillar de mama¹⁷⁶, en carcinomas de ovario¹⁷⁷, de colon¹⁷⁸, adenocarcinomas del tracto gastrointestinal^{179, 180}, hepatocarcinoma¹⁸¹, sarcoma sinovial¹⁸² y fibrosarcomas¹⁸³, TNE de íleon¹⁸⁴ y recientemente en TNE pulmonares¹⁸⁵.

1.7.2.2. Represor transcripcional Twist

El factor de transcripción Twist pertenece a la familia b-HLH (del inglés *Helix-Loop-Helix*)¹⁸⁶. Twist, identificado por primera vez en *Drosophila*, es una proteína clave en los procesos de desarrollo en condiciones normales y condiciones patológicas¹⁸⁶. Durante el desarrollo embrionario, Twist es imprescindible tanto en los primeros estadios (la gastrulación y en la simetría dorso-ventral)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ como en estadios avanzados, en los que los diferentes niveles de expresión de Twist son responsables de que las células del mesodermo se orienten a los diferentes linajes de diferenciación celular¹⁸⁹. Asimismo, coopera con Snail1 en múltiples fases del desarrollo como un factor determinante del mesodermo¹⁹⁰. Mutantes de Snail1 y Twist presentan fallo en la invaginación ventral y ausencia de tejido mesodérmico¹⁹¹. Posteriormente se demostró que Twist interviene activamente en la osteogénesis¹⁹² y en la neurogénesis¹⁹³.

La ruta de señalización Wnt/ β -catenina es una de las vías responsables de regulación de la expresión de Twist en la migración de células de *Xenopus*. Wnt1 regula la expresión directa de Twist en *Drosophila* y ratón¹²¹. Estos experimentos han demostrado que Twist es clave en los procesos de migración y destino celular en la morfogénesis del tubo neural-craneal.

Al igual que ocurre con los miembros de la familia Snail, Twist reprime la expresión de cadherina-E por unión a las cajas E (5'-CANNTG-3') del promotor, e

induce la expresión de genes mesenquimales induciendo TEM e invasión y metástasis¹⁹⁴¹⁷⁹. Asimismo, numerosos estudios han caracterizado a la proteína Twist como un factor clave en proceso de invasión e intravasación¹⁵⁶ además de poseer propiedades angiogénicas¹⁹⁵, resistencia de drogas¹⁹⁶ etc. La sobreexpresión de Twist se ha asociado con la malignización en el proceso de carcinogénesis en una amplia variedad de carcinomas, incluyendo el gástrico, próstata, vejiga, ovario, páncreas, hígado y mama y colon.^{96, 156, 197}.

Recientemente se ha demostrado que Twist desencadena TEM en células epiteliales a través de la inducción de la expresión de Snail2. Durante este proceso Twist se une a regiones conservadas del promotor de Snail2 e induce su transcripción. Por un lado, se ha comprobado en modelos murinos que la inducción de Snail2 es esencial para que Twist induzca la invasión celular y las metástasis a distancia y por otra parte se ha correlacionado significativamente la expresión de ambas proteínas en tumores humanos de mama¹⁵⁷.

Twist está implicado en el proceso apoptótico, capaz de inhibir el oncogén ARF y la muerte celular dependiente de p53. Estas observaciones han llevado a proponer también a Twist como un marcador antiapoptótico¹⁹⁸.

1.7.2.3. “Switch” de cadherinas

Twist induce la expresión de N-cadherina, molécula transmembrana que interacciona a través de uniones homofílicas con células vecinas, fundamentalmente en el tejido neural, y es esencial en el desarrollo embrionario en el proceso de morfogénesis neural y mesodermo. Varios estudios han demostrado mediante el uso de embriones de *Drosophila* -/- para Twist y Snail1, que Twist es esencial para la inducción de la expresión de N-cadherina durante la gastrulación, mientras que Snail1 sería necesario para el aumento de expresión de esta cadherina después de la gastrulación¹⁵⁶.

Se ha establecido una clara correlación entre la sobreexpresión de Twist y un aumento en la expresión de N-cadherina¹⁹⁹ en tumores de estómago¹⁷⁹ y próstata²⁰⁰.

Con todos estos resultados Twist es considerado como el responsable del denominado “cambio de cadherinas” (“*cadherin switch*”), por el cual se produce un intercambio de moléculas de cadherina-E por cadherina-N, durante el proceso de TEM²⁰¹, tanto en el proceso carcinogénico como en el desarrollo embrionario en la

formación de neuroectodermo^{202, 203}. Para muchos autores dicho *switch* también se aplica a situaciones en que los niveles de expresión de cadherina-E no varían pero si de N-cadherina. Varios estudios han demostrado que la expresión de N-cadherina favorece la adquisición de motilidad en las células epiteliales y por tanto es considerado actualmente como un marcador mesenquimal²⁰⁴⁻²⁰⁶.

1.7.2.4. Proteínas Fox

Las proteínas Fox (del inglés *Forkhead box*) componen una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia²⁰⁷⁻²⁰⁹.

Estructuralmente se caracterizan por presentar una secuencia de 80-100 aminoácidos (*forkhead box*), que adopta forma de horquilla, responsable de unión al DNA²¹⁰.

La familia Fox se expresa en diversos tejidos y órganos, tanto en el desarrollo embrionario como en el individuo adulto²¹¹. En concreto la proteína FoxC2, pertenece como su nombre indica a la subfamilia “C” y está directamente implicado en el desarrollo cardiovascular²¹², en los primeros estadios de la organogénesis renal, como la diferenciación de podocitos y maduración de la membrana basal glomerular²¹³⁻²¹⁵.

Otros autores han demostrado la implicación de Foxc2 en el proceso de angiogénesis interaccionando con VEGF y proteínas de la ruta de señalización Notch²¹⁶, induciendo la expresión de integrina $\beta 3$, contribuyendo a la migración de células endoteliales y su adhesión^{217, 218}. Está involucrado activamente en la linfangiogénesis y define el fenotipo de los capilares linfáticos y vasos linfáticos colectores. En los adultos se expresa abundantemente tanto en los vasos linfáticos como en las válvulas linfáticas. Los vasos linfáticos colectores en ratones FOXC2 -/- pierden las válvulas, mientras que los capilares linfáticos adquieren recubrimientos ectópicos con componentes de la lámina basal y células de músculo liso^{219, 220}.

En los últimos años, varios estudios han demostrado la implicación de Foxc2 en la progresión tumoral. Su sobreexpresión en modelos murinos incrementó el potencial invasivo de células tumorales de mama con posterior metástasis pulmonar. Además, la sobreexpresión de Foxc2 en células MDCK (del inglés *Madin-Darby Canine Kidney*) desencadenó el proceso de TEM con incremento en la capacidad migratoria e invasiva de células epiteliales tubulares. En este estudio se demostró que Foxc2 no es en sí

mismo un represor directo de cadherina-E, sino que está inducido por los represores clásicos tales como Snail1, Snail2 así como por TGF- β ¹⁵⁸. Foxc2 no afecta a los niveles de RNAm de cadherina-E sino que dirige a las moléculas de cadherina-E hacia el citoplasma, impidiendo que las posibles moléculas recién sintetizadas se anclen a la membrana. Por este motivo se considera que Foxc2 se encarga de mantener el componente mesenquimal en el programa de TEM¹⁵⁸.

2. HIPÓTESIS

Por todo lo anteriormente expuesto, planteamos las siguientes hipótesis.

La capacidad invasiva y metastatizante de los tumores neuroendocrinos es consecuencia de un proceso de Transición Epitelio-Mesénquima en el frente de invasión del tumor primario. Este proceso es desencadenado por la expresión de factores de transcripción como Snail1, Snail2, Twist, Foxc2, represores del gen de cadherina-E.

Las alteraciones moleculares de estas proteínas pueden servir como marcadores diagnósticos o pronósticos en los TNE de pulmón y GEP.

3. OBJETIVOS

Para contrastar las hipótesis enunciadas, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la expresión proteica de los factores desencadenantes de la Transición Epitelio-Mesénquima (Snail1, Snail2, Twist, Foxc2), así como de las moléculas alteradas en dicho proceso (Cadherina-E, β -catenina y Cadherina-N).
2. Estudiar la expresión génica de dichas moléculas, por análisis RT-PCR en muestras congeladas de tumores neuroendocrinos procedentes del Banco de Tumores del Hospital Universitario Central de Asturias.
3. Relacionar los hallazgos moleculares con variables clinicopatológicas como edad, sexo, diagnóstico, localización anatómica, tamaño tumoral, índice mitótico y de proliferación, desarrollo de metástasis ganglionares y a distancia, estadio, consumo de tabaco y alcohol y grado tumoral.
4. Establecer el valor pronóstico de los hallazgos moleculares, mediante análisis de supervivencia univariante (Kaplan Meier) y multivariante (Cox).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos propuestos, utilizamos el material y la metodología descritos a continuación.

4.1. Selección de pacientes y muestras

Los pacientes seleccionados para el estudio fueron aquellos diagnosticados con:

- ✓ TNE de pulmón entre los años 1990 y 2009 en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Instituto Nacional de Silicosis y Centro Médico de Asturias.
- ✓ TNE GEP entre los años 1999 y 2009 en HUCA y el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Con el fin de crear una base de datos para estos dos grupos de pacientes, se solicitó autorización a la Comisión Oncológica del Centro Hospitalario para revisar las historias clínicas facilitadas a través del Registro Hospitalario de Tumores.

Se recogieron las variables clínicopatológicas de los pacientes y sus tumores, así como los datos de evolución de la enfermedad, quedando los casos distribuidos según se indica en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9: Frecuencias de Serie de TNEGEP		
	TNEGEP (Excl. Apéndice) (%)	TNE Apéndice (%)
Edad		
	(Media 60 años; rango 36-87)	(Media 40 años; rango 10-76)
<60 años	49(53,8)	<40 11 (57,9)
>60 años	42(46,2)	>40 8 (42,1)
Sexo		
Hombre	49 (53,8)	12 (63,2)
Mujer	42 (46,2)	7 (36,8)
Hábitos tabáquicos		
No fumador	26 (28,6)	4 (21,1)
Fumador	29 (31,9)	2 (10,5)
Perdidos	36 (39,6)	13 (68,4)
Hábitos alcohólicos		
No bebedor	31 (27,7)	4 (21,1)
Bebedor	31 (27,7)	2 (10,5)
Perdidos	36 (39,6)	13 (68,4)

Diagnostico OMS		
TNE G1 (carcinoide)	49 (53,8)	16 (84,2)
TNE G2	17(18,7)	1 (5,3)
CNE G3-CG	5 (5,5)	1 (5,3)
CNE G3-CP	20 (22)	1 (5,3)
Localización tumoral		
Estómago	18 (19,8)	-
Intestino delgado	28 (30,8)	-
Páncreas	22 (24,2)	-
Colon y recto	23 (24,2)	-
Tamaño tumoral		
< media 2,7 cm	49 (53,8)	<1,2 13 (68,4)
> media 2,7 cm	36 (39,6)	>1,2 1(5,3)
Perdidos	6 (6,6)	5(26,3)
Diferenciación histológica		
Bien diferenciado	68 (74,7)	18 (94,7)
Poco diferenciado	23 (25,3)	1 (5,3)
Estadio		
I	23 (25,3)	8 (42,1)
IIA	7 (7,7)	3 (15,8)
IIB	7 (7,7)	1 (5,3)
IIIA	1 (1,1)	-
IIIB	24 (26,4)	-
IV	21 (23,1)	2 (10,5)
Perdidos	8(8,8)	5 (26,3)
Grado tumoral		
G1	49 (53,8)	15 (78,9)
G2	17 (18,7)	2 (10,5)
G3	25 (27,5)	2 (10,5)
Índice mitótico (x 10 CGA)		
< 2 Mitosis	59 (64,8)	16(84,2)
3-20 Mitosis	16 (17,6)	3(15,8)
>20 Mitosis	16 (17,6)	-
Índice de proliferación (Ki67%)		
< 2%	50 (54,9)	15(78,9)
2-20%	17 (18,7)	2 (10,5)
>20%	24 (26,4)	2 (10,5)
Invasión vascular		
Ausente	48 (52,7)	17 (89,5)
Presente	43 (47,3)	2 (10,5)

Afectación ganglionar		
Ausente	59 (64,8)	18 (94,7)
Presente	32 (35,2)	1 (5,3)
Necrosis		
Ausente	71 (78)	18 (94,7)
Presente	20 (22)	1 (5,3)
Metástasis a distancia		
Ausente	70 (76,9)	17 (89,5)
Presente	21 (23,1)	2 (10,5)
Supervivencia media (meses)		
Serie completa	33	26
Vivos	38	28
Exitus	23	1

Tabla 10: Frecuencias Serie de TNE de pulmón	
	Frecuencia (%)
Edad (Media 56 años; rango 16-87)	
<56 años	62 (46,3)
>56 años	72 (53,7)
Sexo	
Hombre	89 (66,4)
Mujer	45 (33,6)
Hábitos tabáquicos	
No fumador	52 (38,8)
Fumador	82 (61,2)
Diagnóstico OMS	
TC	66 (49,3)
CA	10 (7,5)
CNCG	18 (13,4)
CPCP	40 (29,9)
Tamaño tumoral (Media 3 cm.)	
<3 cm.	80 (59,7)
>3 cm.	54 (40,3)
Afectación ganglionar	
Ausente	84 (62,7)
Presente	45 (33,6)
Mitosis (x 10 CGA)	

<2 Mitosis	64 (47,8)
3-20 mitosis	11 (8,2)
>20 mitosis	35 (26,1)
Necrosis	
Ausente	68 (50,7)
Presente	45 (33,6)
Supervivencia media (meses)	
Serie completa	41
Vivos	47
Exitus	19

Para este estudio, se reunieron 112 biopsias de TNEGEP y 134 de TNE de Pulmón, incluidas en parafina, procedentes de los Archivos del Servicio de Anatomía Patológica de cada centro, tras obtener el consentimiento para su utilización en investigación por la comisión de Ética Asistencial.

Tras la revisión de las muestras con el patólogo, se seleccionaron las zonas representativas de cada tumor. Para su estadificación se aplicó el sistema TNM según las recientes clasificaciones de la OMS de los años 2004 y 2010 para los TNE pulmonares y GEP, respectivamente (Tablas 2 y 3).

4.2. Elaboración de matrices de tejido

Se reunieron todas las muestras en el Banco de Tumores, donde se procedió a la elaboración de las matrices de tejido (TMA, del inglés "*Tissue MicroArray*"). Se repartieron las muestras de zonas representativas del tumor, por triplicado, resultando un total de 8 TMAs, de los que se obtuvieron secciones de 4µm de grosor en el microtomo, permanecieron en una estufa a 60° C durante 12 horas, con el fin de conseguir una adherencia óptima del tejido al portaobjetos. Parte del material cortado fue teñido con hematoxilina-eosina y otra parte fue reservada para estudios inmunohistoquímicos.

Las muestras destinadas a la extracción de ARN se obtuvieron del Banco de Tumores del HUCA, donde estaban conservadas a -80° C. De los 134 pacientes con TNE Pulmonares seleccionados para el estudio, se encontraron disponibles bloques de tumores congelados de 38 casos, de los cuales 20 disponían de tejido sano. De los 119 pacientes con TNE GEP solo se recogieron 15 casos, de los cuales 10 disponían de tejido sano.

4.3. Técnica inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico permite la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos, mediante la aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales. Desde que A. Coons descubriera la técnica en la década de 1940, esta herramienta se ha convertido en una de las técnicas más habituales e imprescindibles para muchos laboratorios a través de muchas aplicaciones. Su automatización, en el siglo XX aumentó el poder de este método para demostrar la presencia de antígenos únicos en los tejidos y células. De esta manera, es posible determinar la localización e intensidad de su expresión.

Las proteínas de interés en el presente trabajo fueron: Snail1, Snail2, Twist, Foxc2, Cadherina-E, β -catenina, Cadherina-N, Vimentina, CD68.

Una variante en la técnica inmunohistoquímica es la inmunodetección indirecta, la cual se basa en la aplicación sobre el tejido de un anticuerpo primario cuya región Fc es reconocida por un segundo anticuerpo marcado. Este método es mucho más sensible que la inmunodetección directa (sin anticuerpo secundario) ya que el anticuerpo primario es reconocido por más de una molécula de anticuerpo secundario, que se traduce en una amplificación de la señal. Lo más habitual es el uso de estos anticuerpos secundarios conjugados con estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) que, mediante una reacción enzimática, cataliza la oxidación por peróxido de hidrógeno de 3,3'-tetrahidrocloruro diaminobencidina (DAB), generándose un precipitado insoluble de color marrón que puede ser visualizado. Este cromógeno actúa como donante de electrones mientras que el peróxido de hidrógeno es el sustrato de la peroxidasa.

En nuestro estudio, se ha utilizado un sistema de anticuerpo secundario libre de biotina basado en la tecnología de multímeros, denominado OmniMap™ anti-Rabbit (Ventana Medical Systems, Arizona). Se compone de un multímero de alto peso molecular, conjugado covalentemente con un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo peroxidasa de rábano, hasta 100 moléculas por cadena) y de anticuerpo secundario (hasta 20 moléculas por cadena). Este marcaje permite disminuir el tiempo de incubación y la concentración de uso de los anticuerpos, con una mejora en la amplificación de la señal si la comparamos con el sistema biotina-avidina. Proporciona fondo limpio en combinación con una mayor especificidad y sensibilidad, lo que aumenta la relación señal / ruido. Están diseñados para usarse en conjunto en el sistema automático de tinción DISCOVERY® (Ventana Medical Systems, Arizona),

proporcionando resultados reproducibles y comparables. El procedimiento se inició en este equipo tras el desparafinado de las muestras con EZ Prep (Ventana Medical Systems, Arizona). En todos los casos fue necesaria la recuperación antigénica, procedimiento por el cual se logra el desenmascaramiento del antígeno, eliminando los enlaces cruzados y los iones calcio, generados por el uso de fijadores, como el formol. Para ello, se trataron las muestras a elevada temperatura en tampón citrato CC2 (Ventana Medical System, Arizona), a pH 6 a 100°C para las incubaciones del anticuerpo anti-Snail1, anti-Snail2, anti-Foxc2, anti-Twist y anti-β-catenina durante 8 minutos. Para las incubaciones de anti-cadherina-E, anti-cadherina-N y anti-Vimentina, la recuperación antigénica se realizó en tampón Tris-EDTA CC1 (Ventana Medical System, Arizona) a pH 9 a 100°C durante 8 minutos.

El tratamiento utilizado para bloquear y eliminar la actividad peroxidasa endógena fue la incubación con peróxido de hidrógeno al 3% (Ventana Medical System, Arizona) durante 4 minutos. Por otra parte, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo se utilizó como bloqueante, caseína al 1% (Ventana Medical System, Arizona) durante 30 minutos. La incubación para todos los anticuerpos se realizó de 37°C. En la tabla 11 se recogen los anticuerpos primarios utilizados, la casa comercial, dilución aplicada y tiempo de incubación.

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Dilución	Tiempo de incubación
Snail1	Conejo	Abcam Cambridge, UK (ab63371)	1:300	60 min.
Snail2	Conejo	Abcam Cambridge, UK	1:100	60 min.
Twist	Conejo	Abcam Cambridge, UK (ab50581)	1:1000	30 min
Foxc2	Conejo	ABR Affinity Bioreagents, Colorado USA	1: 600	30 min
Cadherina-E	Ratón	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	20 min.
β-catenina	Ratón	Sigma, Missouri, USA	1:1000	20 min.
Cadherina-N	Ratón	Becton Dickinson, NJ, USA	1:200	30 min.
Vimentina	Ratón	Ventana Medical System, Arizona	1:100	20 min.
CD68	Ratón	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:2000	60 min

Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (a temperatura ambiente durante 15 minutos) se llevó a cabo el revelado añadiendo a las muestras el cromógeno (DAB) y peróxido de hidrógeno (ChromoMap, Ventana Medical System, Arizona), responsables de la reacción cromogénica.

Se realizó una tinción con Hematoxilina (Ventana Medical System) en todas las preparaciones, proporcionando contraste a la reacción, para finalmente deshidratar y montar las preparaciones con Entellan® (Merck, Alemania).

4.4. Técnica de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia indirecta (IF) es una técnica que, al igual que la inmunohistoquímica indirecta, emplea anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que, al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda, son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor.

Mediante el uso de dos marcadores fluorescentes que emiten energía de longitud de onda diferente, es posible determinar simultáneamente en una preparación la localización de dos antígenos, con el fin de detectar una posible colocalización espacial de dos proteínas.

Esta técnica se ha utilizado para demostrar la expresión de Snail1 en macrófagos activos. Para ello utilizamos el marcador específico de macrófagos, CD68. El procedimiento fue idéntico a la técnica inmunohistoquímica hasta la incubación de ambos anticuerpos primarios, la cual se realizó conjuntamente durante 60 min a 37°C en el sistema automático de tinción DISCOVERY® (Ventana Medical Systems, Arizona). Transcurrido este tiempo las muestras se lavaron con tampón fosfato y se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios fluorescentes: Policlonal Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, USA) y Monoclonal Alexa Fluor® 546 (Invitrogen, USA) durante 60 min cada uno, en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron montadas en medio acuoso (SouthernBiotech, USA) con DAPI (Invitrogen, USA).

La colocalización se visualizó en el equipo microscopio confocal, Leica TCS SP2, utilizando las siguientes fuentes de iluminación para la excitación de cada fluorocromo: láser Argon/Krypton 488nm, láser Helio/Neon 543nm y Diodo Azul-violeta 405nm respectivamente.

4.5. Valoración de las tinciones inmunohistoquímicas

La evaluación de cada muestra se realizó conjuntamente con el patólogo al microscopio óptico, de la manera siguiente:

Respecto a los factores de transcripción, se valoraron tanto la intensidad de la tinción nuclear (en una escala 0-3), como el porcentaje de núcleos positivos (0%-100%). El producto de ambos parámetros proporcionó una puntuación para cada caso. Con fines estadístico, cada una de las variables se dicotomizó en función del valor de la mediana para la población en estudio. El mismo criterio se aplicó a la valoración de las tinciones de cadherina-E, cadherina-N y β -catenina, para las cuales se consideró también su localización, en función de su presencia o ausencia de la membrana. Para el caso de la expresión de vimentina solo se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de la tinción.

4.6. Aislamiento de ARN

El ARN total se extrajo mediante el método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Ambion) de Chomczynski y Sacchi²²¹, basado en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción con cloroformo y precipitación del ARN total con isopropanol, a partir de la fase acuosa.

El tejido se homogeneizó mecánicamente en 1 ml de TRIZOL y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, tras lo cual el ARN, que se localizaba en la fase superior acuosa, se transfirió a un tubo con 500 μ l de isopropanol, donde fue precipitado. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

4.7. Determinación de la concentración e integridad del ARN

Tras la extracción de ARN, su integridad se evaluó normalmente observando las dos bandas mayoritarias correspondientes al ARN ribosomal: 18S y 28S mediante métodos electroforéticos, en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Para valorar la calidad del ARN en este estudio, se utilizó la tecnología del *Agilent 2100 Bioanalyzer* y ARN Nano Labchip® (Agilent Technologies). Se trata de un dispositivo que combina una electroforesis microcapilar de microfluidos y detección fluorescente, proporcionando un electroferograma que relaciona la medida de la fluorescencia con los tamaños moleculares. Con la ayuda de un programa informático,

se determinó la relación entre las bandas de ARN ribosomal, la concentración de la muestra y el RIN (del inglés “*RNA Integrity Number*”) cuyo valor indica el estado en el que se encuentra el ARN²²². Se considera que el ARN es de buena calidad cuando su RIN se encuentra por encima de 6 y el ratio 28S:18S es próximo a 2. De los 38 casos de TNE de Pulmón inicialmente disponibles, se descartaron 8 por no proporcionar un ARN de calidad aceptable para el estudio.

De los 15 casos de TNEGEP solo 2 casos presentaron ARN de calidad, por lo que se decidió descartar esta serie para el análisis de expresión de ARNm.

4.8. Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-Q-PCR)

Para los casos que mostraban un ARN de calidad apropiada, se obtuvo el cDNA mediante RT-PCR. Esta se llevó a cabo con GeneAmp ARN-PCR (Applied Biosystems), para la cual se utilizó 1 µg de ARN total y hexámeros aleatorios como cebadores hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones de RT-PCR utilizadas fueron las siguientes:

1. 15 min. a 42 °C (retrotranscripción)
2. 5 min. a 99 °C (desnaturalización)
3. 5 min. a 5 °C.

Para comprobar la calidad del cDNA, se realizó una PCR control en condiciones estándar, utilizando BioTaq DNAPol (Bioline) y los oligonucleótidos específicos (Thermo Scientific) para la amplificación del gen que codifica β-actina, que genera un fragmento de 353 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores ABI9700 (Applied Biosystems) y *Mastercycle egradient* (Eppendorf). El resultado de la reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4%.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo para cuantificar la expresión génica del factor de transcripción Snail1 (gen *SNAI1*), de la cadherina-E (gen *CDH1*), de Twist (gen *TWIST1*), de Foxc2 (gen *FOXC2*) y de cadherina-N (gen *CDH2*), de todas las muestras tumorales seleccionadas y de tejido sano peritumoral disponible, empleando *GAPDH* como gen endógeno.

Para llevar a cabo la técnica, se utilizó TaqMan® Gene Expresión Assays (Applied Biosystems) que contiene los cebadores directo y reverso específicos del gen en cuestión junto con la sonda TaqMan MGB (6-FAM). Este tipo de sonda se

caracteriza por poseer en el extremo 5' un fluoróforo (6-carboxi fluoresceína o FAM) y en el extremo 3' un “quencher” no-fluorescente asociado a un motivo de unión al surco menor de la doble hélice del ADN (MGB, del inglés “Minor Groove Binder”). Este diseño permite que la sonda sea más corta y más específica con la misma T_m .

Las reacciones de PCR para los seis genes (*SNAI1*, *CDH1*, *TWIST1*, *FOXC2*, *CDH2* y *GAPDH*) se realizaron en un volumen final de 20 μ l con 0,3 μ l de cDNA, 10 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (con AmpErasa® UNG, que evita contaminaciones con productos de PCRs anteriores) (Applied Biosystems) y 1 μ l de TaqMan® Gene Expresión Assays y fueron llevadas a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min. a 50 °C (temperatura de activación de la AmpErasa® UNG), 10 min. a 95°C (activación de la DNA pol) y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min. a 60°C (amplificación). Todas las reacciones se realizaron con el sistema de detección 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

La cuantificación de la amplificación se realizó de la siguiente manera:

- Cálculo de Ct (del inglés “threshold cycle”, ciclo umbral en el que se detecta por primera vez el producto de amplificación): tomando el valor medio de los duplicados llevados a cabo para los genes diana (*SNAI1*, *CDH1*, *TWIST1*, *FOXC2*, *CDH2*) y el gen control (*GAPDH*) en todas las muestras tumorales y en las muestras de tejido normal disponibles.
- Cálculo de ΔC_t : diferencia entre el Ct de los genes a estudio (*SNAI1*, *CDH1*, *TWIST1*, *FOXC2*, *CDH2*) y el Ct del gen endógeno (*GAPDH*) en cada muestra (T, tumoral, N, sana).
- Cálculo de $\Delta\Delta C_t$: diferencia entre ΔC_t del tumor (T) respecto al tejido sano (N), en los casos disponibles.
- Q, determina la magnitud del cambio (“fold change”). Los cambios fueron considerados cuando $Q \geq 2$.

$$\begin{aligned}\Delta C_t^T &= (C_t^{Snail} - C_t^{GAPDH})^T \\ \Delta C_t^N &= (C_t^{Snail} - C_t^{GAPDH})^N \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t^T - \Delta C_t^N \\ Q &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

4.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados moleculares y parámetros clínico-patológicos, se aplicó el test Chi-cuadrado (χ^2) (con la corrección de Yates en caso conveniente). Se utilizó el test t de Student o U de Mann-Whitney para la comparación de variables numéricas continuas paramétricas o no paramétricas, respectivamente, con otras variables categóricas dicotómicas, con la ayuda del programa del paquete estadístico SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Con este mismo programa se calcularon las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se analizaron mediante el método de log-rank. Se llevó a cabo un análisis multivariante (para examinar el impacto relativo de las variables que dieron resultados significativos en análisis univariante) mediante el método de regresión de Cox (*Forward Wald*). Los valores p corresponden a test bilaterales. Se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Valoración inmunohistoquímica de la expresión proteica

La valoración de la inmunotinción de cadherina-E, cadherina-N y β -catenina se realizó considerando la intensidad de la señal (débil *vs.* elevada) y su patrón (membrana *vs.* citoplasma, con la salvedad de que β -catenina puede presentar además de los patrones descritos, localización nuclear).

Para los represores transcripcionales, solo se tuvo en cuenta la expresión, débil o elevada (para la serie de pulmón) y ausente o presente (para la serie GEP) de la señal nuclear, puesto que es en el núcleo donde están activos, ejerciendo la función represora.

La valoración de la inmunotinción de Vimentina se realizó considerando la presencia o ausencia de señal en las células tumorales.

En la Figura 11 y 12 se muestran un ejemplo representativo de todos los patrones de tinción de cada marcador.

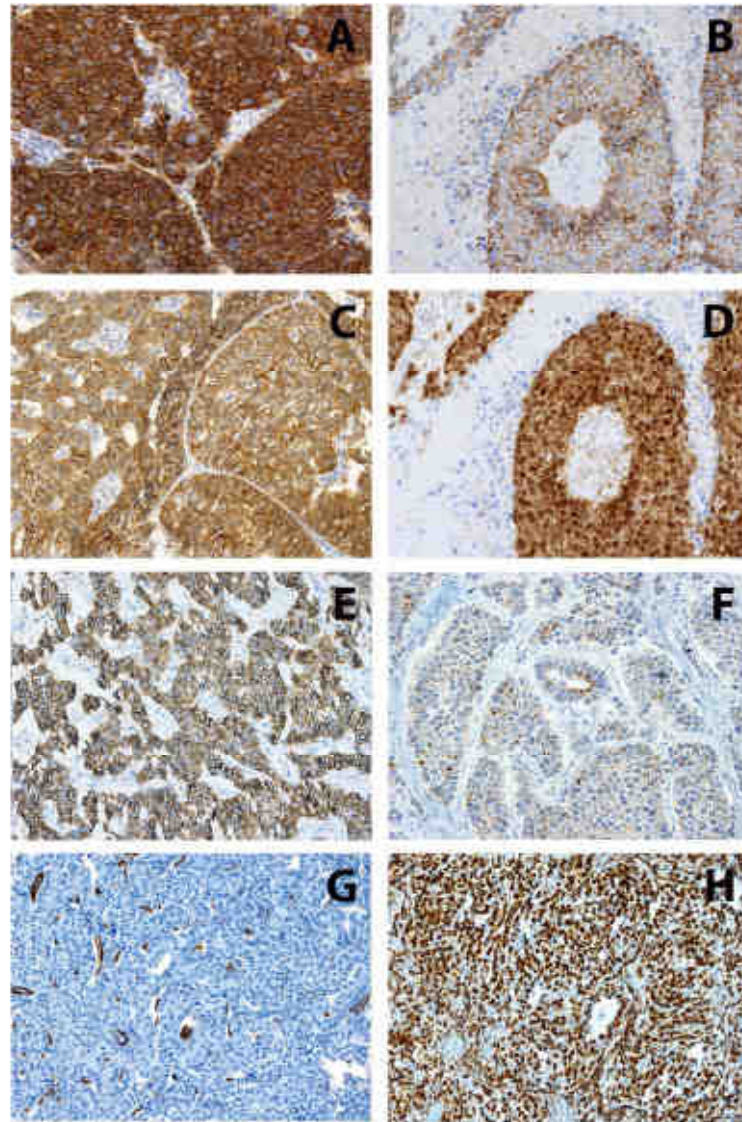


Figura 11: A: Intensidad elevada y de membrana de cadherina-E; B: Intesidad débil de cadherina-E; C: Intensidad elevada y de membrana de β -Caterina; D: Patrón nuclear de β -Caterina; E: Intesidad elevada y de membrana de cadherina-N; F: Intesidad débil y citoplásmica de cadherina-N; G: Inmunotinción negativa de Vimentina; H: Inmunotinción positiva de Vimentina

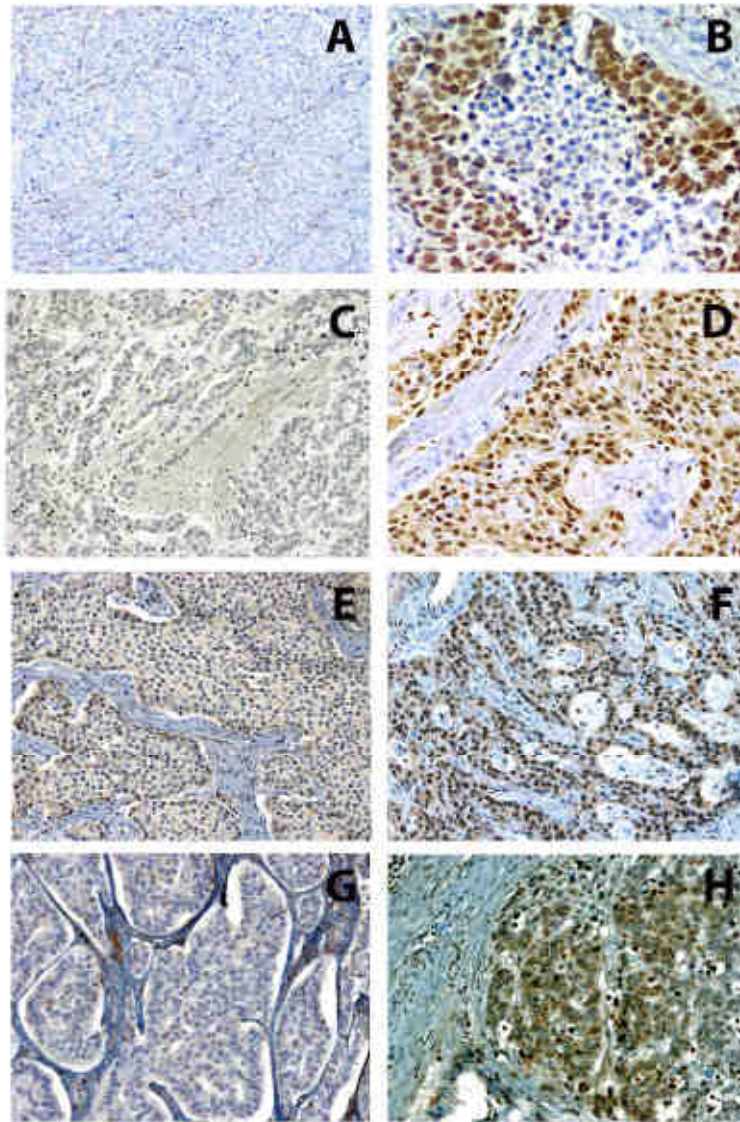


Figura 12: A: Expresión negativa de Snail1; B Expresión positiva de Snail1. C: Expresión negativa de Snail2; D: Expresión positiva de Snail2; E: Ausencia de Twist1, F: Expresión positiva de Twist1; G: Expresión negativa de Foxc2; H: Expresión positiva de Foxc2

5.1. ANÁLISIS DE LA SERIE DE TNE DE PULMÓN

5.1.1. Análisis inmunohistoquímico en el epitelio respiratorio sano

En las muestras normales de epitelio respiratorio sano, cadherina-E (Fig.13-B) y β -catenina (Fig. 13-C) presentaban una tinción elevada con un patrón lineal de membrana, mientras que se detectó señal nuclear débil o nula de Snail1 (Fig. 13-D), Snail2 (Fig. 13-E), Twist (Fig. 13-F) y Foxc2 (Fig. 13-G). Tanto la cadherina-N como Vimentina resultaron negativas (Fig. 13 H-I respectivamente).

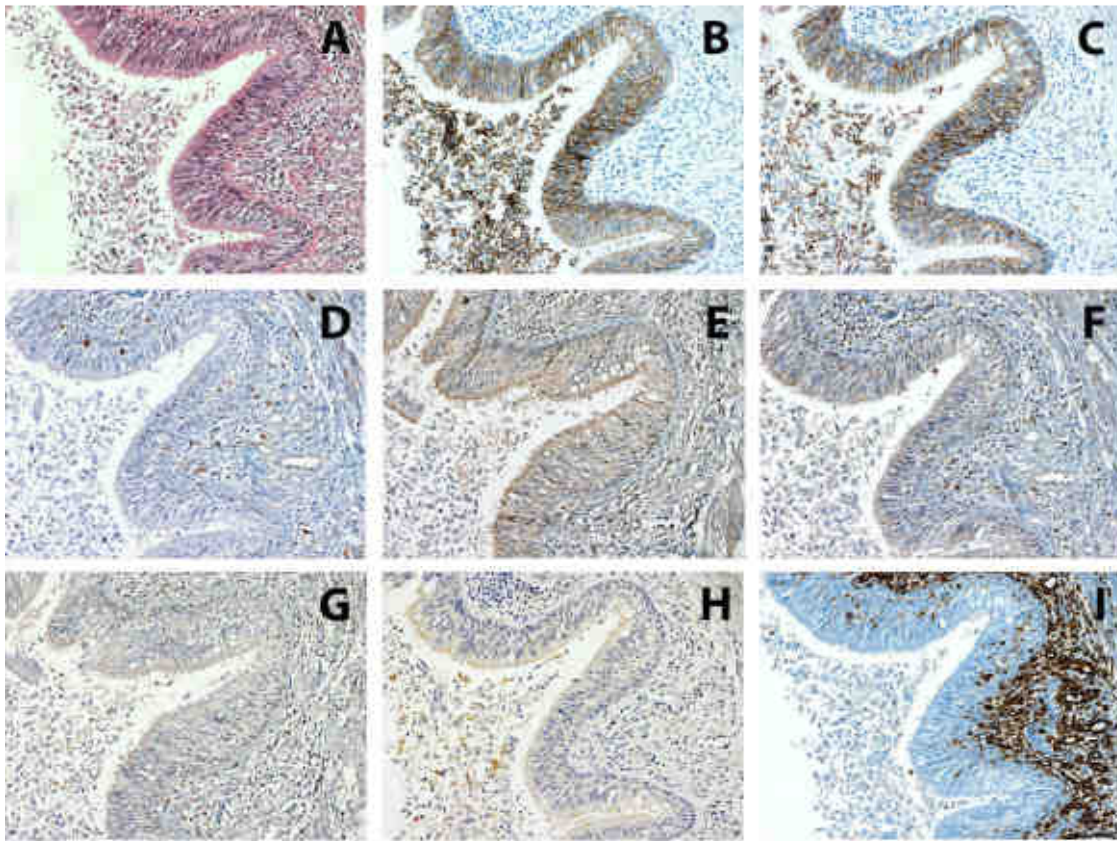


Figura 13: Expresión de los marcadores implicados en TEM en el epitelio respiratorio sano

5.1.2. Frecuencias de las valoraciones moleculares en los TNE de pulmón

La serie de TNE de pulmón constaba de 134 muestras. Del análisis inmunohistoquímico de cada marcador, se obtuvieron las siguientes frecuencias, recogidas en la tabla 12:

Tabla 12		
		Frecuencias (%)
Expresión cadherina-E	Débil	71 (53)
	Elevada	63 (47)
Patrón cadherina-E	Membrana	65 (48,5)
	Citoplasma	57 (42,5)
Expresión β -catenina	Débil	66 (49,3)
	Elevada	68 (50,7)
Patrón β -catenina	Membrana	75 (56)
	Citoplasma	31 (23,1)
	Núcleo	8 (6)
Integridad del complejo cadh-E/ β -cat.	Íntegro	51 (38,1)
	Alterado	83 (61,9)

Expresión cadherina-N	Débil	67 (50)
	Elevada	67 (50)
Patrón cadherina-N	Membrana	45 (33,6)
	Citoplasma	56 (41,8)
Expresión Snail1	Débil	73 (54,5)
	Elevada	61 (45,5)
Expresión Snail2	Débil	77 (57,5)
	Elevada	57 (42,5)
Expresión Twist	Débil	71 (53)
	Elevada	63(47)
Expresión Foxc2	Débil	92 (68,7)
	Elevada	42 (31,3)
Expresión Vimentina	Negativa	126 (94)
	Positiva	7 (5,2)

5.1.3. Asociaciones entre las variables clínico-patológicas y valoraciones moleculares en TNE de Pulmón

Los tumores de alto potencial de malignidad (CNCG y CPCP) presentaron una expresión reducida tanto de cadherina-E, β -catenina, como de cadherina-N, en comparación con los tumores de bajo grado (Carcinoides) ($p=0,0001$) En el modelo aceptado para TEM – asociado a malignidad tumoral - se describe un cambio de expresión de cadherinas, llamado “*switch*” de cadherinas, según el cual se produciría un aumento en la expresión de cadherina-N con o sin reducción de la expresión de cadherina-E. En la serie estudiada no observamos dicho cambio, es más, la cadherina-N no solo no aumenta su expresión con el desarrollo tumoral, sino que disminuye, siguiendo una tendencia paralela a la de la cadherina-E.

Tanto la cadherina-E como la β -catenina se encontraban localizadas en el citoplasma con mayor frecuencia en los tumores de alto grado de malignidad, respecto a los de bajo grado, por lo que en aquellos tumores se perdía la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina en la membrana ($p=0,0001$).

Adicionalmente, la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina se encontraba perdida en las categorías desfavorables de las siguientes variables clínico-patológicas: tamaño ($p=0,006$), afectación ganglionar ($p=0,0001$), necrosis ($p=0,0001$), IM ($p=0,0001$) y consumo de tabaco ($p=0,0001$).

En cuanto a los represores transcripcionales (Snail1, Snail2, Twist y Foxc2), todos mostraron una expresión proteica superior en los tumores de alto grado ($p=0,0001$), al igual que el marcador mesenquimal Vimentina ($p=0,012$). Para Twist se observó esta asociación también a nivel de ARNm ($p=0,0006$).

Tumores con niveles elevados de proteína Snail1, Snail2, Twist y Foxc2 aparecían con mayor frecuencia en pacientes fumadores, con afectación ganglionar, y cuyos tumores presentaban necrosis y un elevado índice mitótico. Snail1, además se expresaba en niveles superiores en los tumores de mayor tamaño.

En la tabla 8.1 del ANEXO se recogen las correlaciones estadísticas entre todas las variables consideradas.

Figura 14 y 15 muestran la expresión de los marcadores implicados en TEM en los subtipos tumorales en TNE de pulmón.

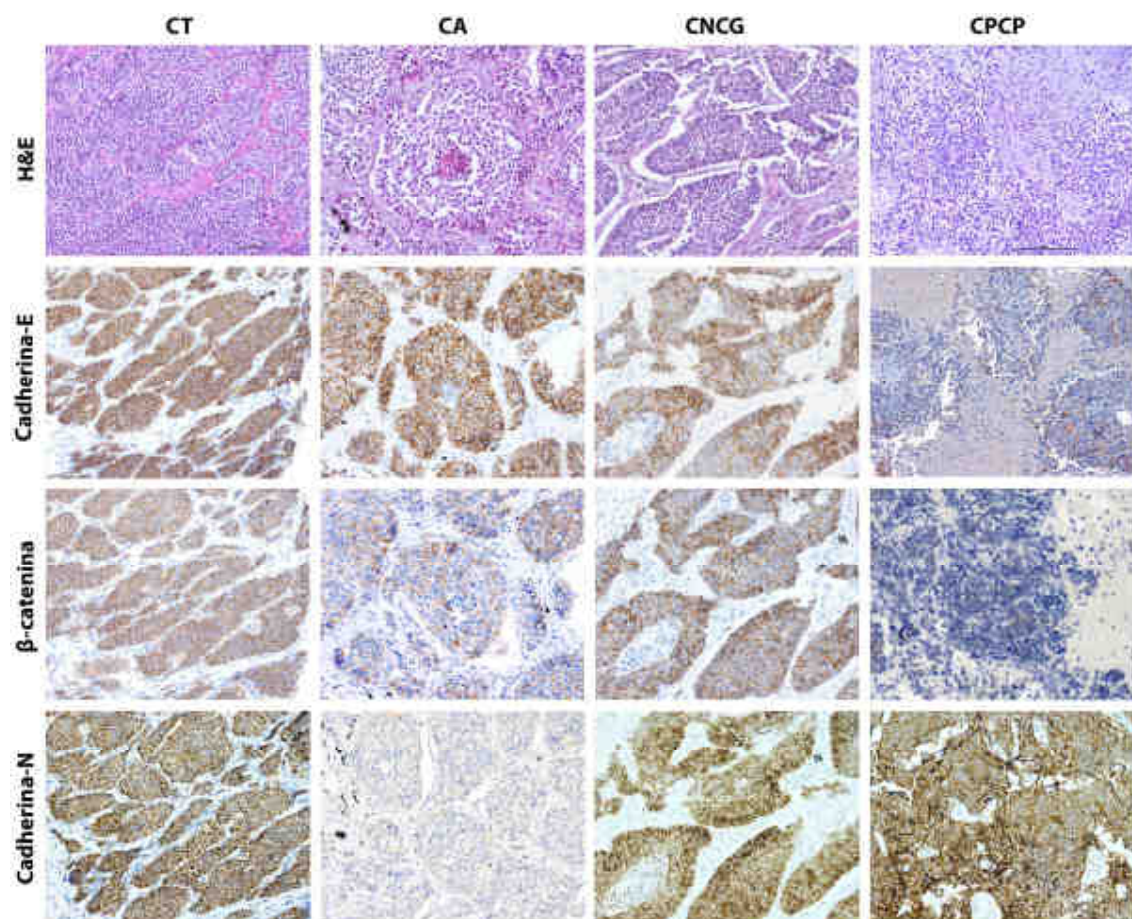


Figura 14: H&E, expresión IHQ de cadherina-E, de β-catenina y cadherina-N en los subtipos tumorales de TNE de pulmón

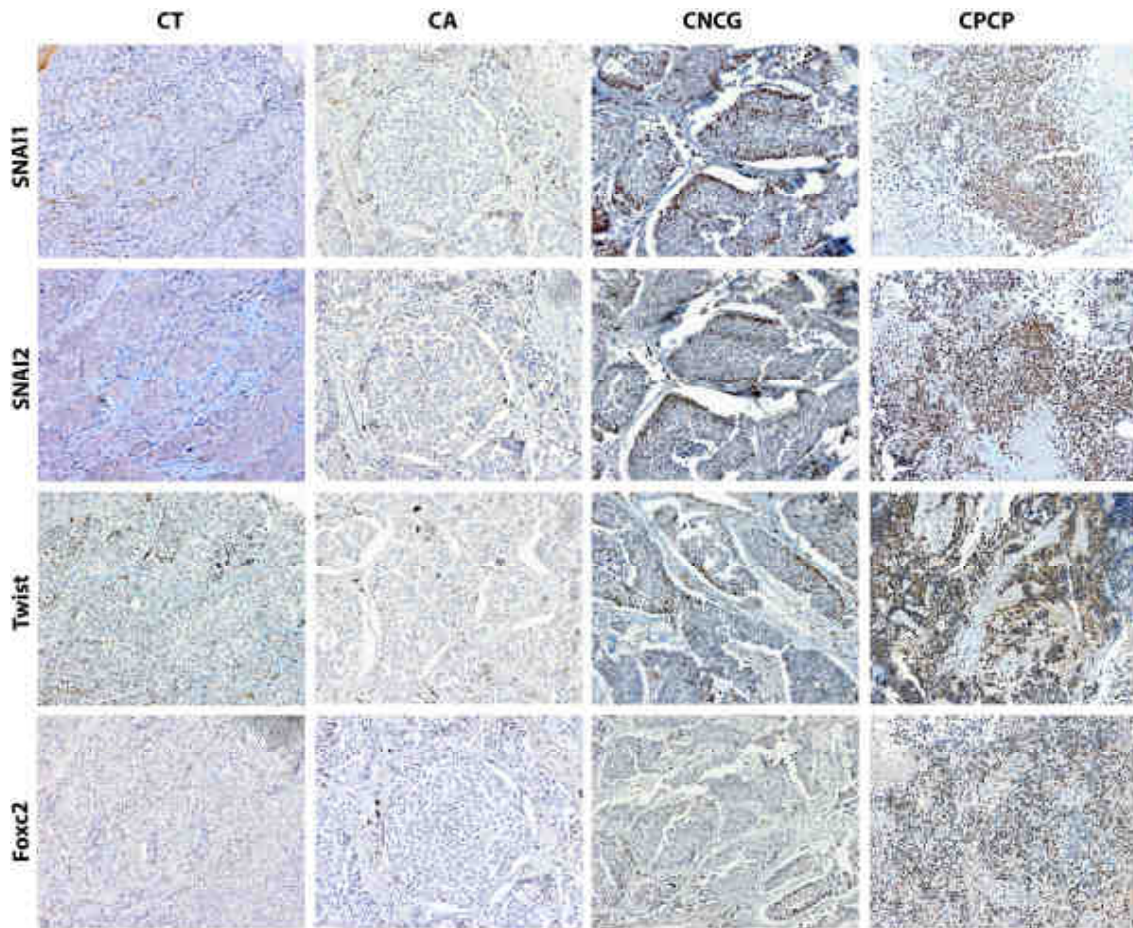


Figura 15: Expresión IHQ de Snail1, Snail2, Twist1 y Foxc2 en los subtipos tumorales de TNE de pulmón

5.1.3.1. Diagnóstico diferencial entre subtipos tumorales de TNE de Pulmón

Con el fin de identificar variables moleculares que discriminasen entre subtipos tumorales, se establecieron comparaciones de cada variable estudiada sobre los grupos de interés (CT vs. CA y CNCG vs. CPCP):

1. Entre las variables que discriminaron CTs de CAs, se observaron diferencias significativas en los patrones de las diferentes moléculas de adhesión: Patrón de cadherina-E ($p=0,0001$), patrón de β -catenina ($p=0,032$) y patrón de cadherina-N ($p=0,011$), así como en la integridad del complejo cad-E/ β -cat ($p=0,009$).

2. En cuanto a las variables que permitieron diferenciar a CNCG de CPCP, se encontraron diferencias significativas de la expresión elevada de Snail1 ($p=0,0001$), de Snail2 ($p=0,0001$) y de Twist ($p=0,001$), así como expresión reducida de cadherina-E ($p=0,001$), β -catenina ($p=0,0001$) y patrón citoplásmico de cadherina-N ($p=0,001$), más frecuentes CPCP que en CNCG.

5.1.4. Asociación entre las variables moleculares

Se observó una correlación inversa entre la expresión de cadherina-E y la expresión de Snail1 ($p=0,02$) y de Snail2 ($p=0,001$) aunque no con la expresión de Twist ($p=0,209$). Este resultado es el esperado, teniendo en cuenta la represión transcripcional ejercida por Snail1 y Snail2 sobre cadherina-E.

Asimismo, el patrón de cadherina-E era de membrana cuando la expresión de los marcadores de TEM era reducida: Snail1 ($p=0,0001$), nivel de RNAm Snail1 ($p=0,053$, t Student), Snail2 ($p=0,0001$), Twist ($p=0,013$).

En cuanto a Foxc2, se observó que no afectaba a los niveles de cadherina-E, ($p=0,306$), pero sí a su localización, encontrándose en el citoplasma en aquellos casos con niveles elevados de Foxc2 ($p=0,002$). Este resultado concuerda con el papel descrito para Foxc2.

Considerando la variable que refleja la integridad el complejo cadherina-E/ β -catenina en la membrana, se observó que ésta se perdía con mayor frecuencia en los tumores con niveles elevados de Snail1 ($p=0,0001$) y de Snail2 ($p=0,0001$).

Cabe destacar la observación de una correlación inversa entre la expresión de cadherina-N y de Snail2 ($p=0,055$). Además, la pérdida de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina se producía con mayor frecuencia entre los casos con una expresión de cadherina-N reducida ($p=0,020$). Es más, sí se observó una correlación directa entre la localización citoplasmática de cadherina-N en la expresión elevada de Snail1 ($p=0,000$), Snail2 ($p=0,009$), Twist ($p=0,005$) y Foxc2 ($p=0,045$). Es decir, tanto cadherina-E como -N parecen seguir cursos paralelos, más que inversos, lo cual apuntaría de nuevo a una ausencia de llamado “*switch*” de cadherinas.

La expresión de Vimentina se correlacionó significativamente con aumento en la expresión de Snail1 ($p=0,03$) y Snail2 ($p=0,019$) pero no con la expresión de Twist ($p=0,595$) ni con la de Foxc2 ($p=0,510$).

En la tabla 8.2 del ANEXO se recogen las correlaciones estadísticas entre todas las variables moleculares estudiadas.

5.1.5. Análisis de la expresión ARNm mediante RT-PCR cuantitativa: correlaciones

Disponíamos de ARNm de buena calidad de 30 tumores y de 20 tejidos sanos. Tras llevar a cabo las reacciones de RT-Q-PCR, se obtuvieron los valores ΔC_t para cada muestra y diana, tomando *GAPDH* como gen control. Dado que no disponíamos de muestra de tejido sano para el total de los casos, optamos por considerar el valor ΔC_t medio de las 20 muestras de tejido sano, para cada diana, como referencia para los 30 tumores. Así, obtuvimos los siguientes resultados, recogidos en la Tabla 13, en términos de cambios de expresión (“*fold change*”) en el tejido tumoral respecto al sano:

Tabla 13			
N=30	Inalterado	Elevado en tumor	Reducido en tumor
<i>CDH1</i>	15	3	12
<i>CDH2</i>	9	17	4
<i>SNAI1</i>	12	0	18
<i>FOXC2</i>	3	1	26
<i>TWIST1</i>	19	1	10

Casi la mitad de los tumores (12/30) presentaban una expresión de ARNm de cadherina-E reducida, en comparación con los tejidos sanos. Y más de la mitad de los tumores (17/30) mostraban una expresión de ARNm de cadherina-N superior a los tejidos normales.

En cuanto los represores transcripcionales estudiados, observamos una reducción en los niveles ARNm de *SNAI1* (18/30), *TWIST1* (10/30) y *FOXC2* (26/30) en los tumores.

Se observó una correlación entre los niveles de ARNm y proteína de cadherina N ($p=0,0114$, t Student).

El nivel de ARNm de *SNAI1*, *FOXC2* y *TWIST1* era semejante en los tumores que expresaban niveles bajos (ΔC_t medio 8,19; 9,7 y 10,35, respectivamente) y altos (ΔC_t medio 8,17; 9,47 y 10,82, respectivamente) de las correspondientes proteínas, lo cual sería compatible con una regulación a nivel posttranscripcional.

Análogamente, el nivel de ARNm de *CDH1* era semejante en los tumores que expresaban niveles bajos (Δ Ct medio 2,32) y altos (Δ Ct medio 2,79) de la proteína cadherina-E, lo cual sería compatible con una regulación a nivel posttranscripcional.

El nivel de ARNm de *CDH1* es similar en los casos en los que la integridad del complejo se mantiene (Δ Ct medio 2,97) y en los que se pierde (Δ Ct medio 2,44), lo cual sería compatible con la existencia de mecanismos posttranscripcionales que contribuyesen a la alteración del complejo, afectando a la estabilidad de cadherina-E (ARNm y/o proteína) o a su interacción con β -catenina.

5.1.6. Análisis de Inmunofluorescencia (IF) de la expresión proteica de Snail1 en el tejido normal pulmonar

Analizados los resultados de PCR cuantitativa, y teniendo en cuenta la reducción del nivel de ARNm de Snail1 observada en las muestras tumorales frente a las sanas – resultado contradictorio con las observaciones registradas a nivel de proteína –, pensamos en la posibilidad de que la existencia de un infiltrado inflamatorio pudiera ser la fuente de la señal registrada (ya que RT-PCR se lleva a cabo sobre un lisado procedente de todas las células presentes en el tejido, tanto epiteliales como inflamatorias). Mediante inmunotinción con marcadores específicos de células inflamatorias (CD3, CD8, MLX, CD68, datos no mostrados), constatamos que la proporción de células inflamatorias respecto al total de células era superior en los tejidos sanos que en los tumorales, ya que en éstos, la abundancia de células tumorales, la proporción del componente inflamatorio se reduce. De ser así, dicho infiltrado inflamatorio, rico en macrófagos, estaría distorsionando el resultado obtenido en las muestras de tejido sano.

Con el fin de comprobar si dichos macrófagos expresaban Snail1 se llevó a cabo un análisis de doble inmunofluorescencia, con el marcador de macrófagos anti-CD68 (glicoproteína expresada en la membrana plasmática de los macrófagos) y anticuerpo anti-Snail1, sobre 3 muestras representativas de tejido sano pulmonar. Las imágenes obtenidas sugieren una colocalización de ambas proteínas, por lo que podríamos concluir que los macrófagos expresan Snail1 en tejido pulmonar sano (Figura 16).

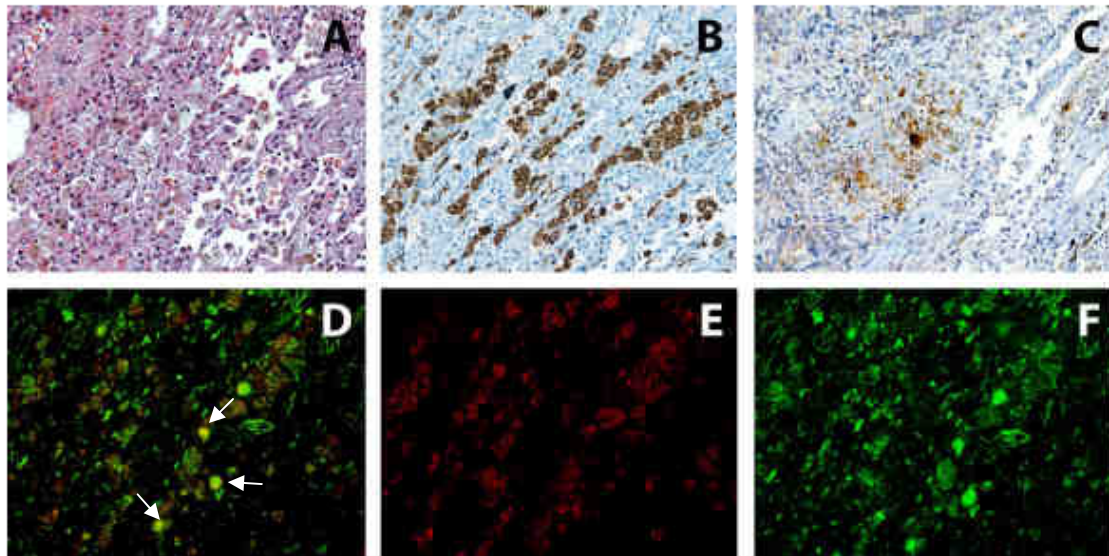


Figura 16: A H&E de tejido pulmonar sano y macrófagos. B: Detección de macrófagos con inmunotinción de CD68; C Expresión de Snail1 en macrófagos. D: Colocalización de Anti-Snail1 y Anti-CD68. E: IF de Anti-CD68 en macrófagos; F: IF de Anti-Snail1 en macrófagos

5.1.7. Análisis de supervivencia en TNE de Pulmón

El tiempo de seguimiento medio para esta serie fue de 90 meses, con un rango de 12-242 meses.

Se analizó el impacto que pudieran tener las diversas alteraciones moleculares estudiadas sobre los tiempos de supervivencia de los pacientes. La tasa de supervivencia de la población global a los cinco años fue del 62,4% (Figura 17).

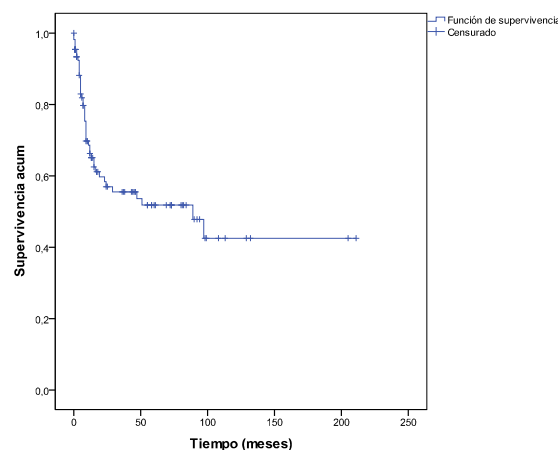


Figura 17: Análisis Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de la población global en función del tiempo (meses)

La supervivencia difería significativamente ($p=0,003$) entre los pacientes cuya edad era mayor o menor que la media (56 años). Así, aquellos pacientes por debajo de

56 años mostraban una supervivencia acumulada a los 5 años de 69% frente al 42 % de los mayores de 56 años [supervivencia media de 150 meses (SE, del inglés *Standard Error*:15, frente a los 75 meses (SE:15) de los pacientes mayores de 56 años] (Figura 18).

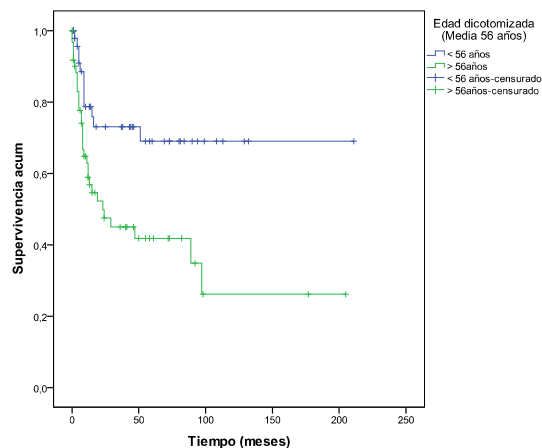


Figura 18: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo a la edad (Media 56 años)

La tasa de supervivencia acumulada de los pacientes estratificados en función del diagnóstico fue significativamente mayor en CT y CA [179 meses (SE:13) y 67 meses (SE:18) meses de media, respectivamente] que en los CNCG y CPCP [27 meses (SE:12) y 28 meses (SE: 6) meses de media, respectivamente] (Figura 19).

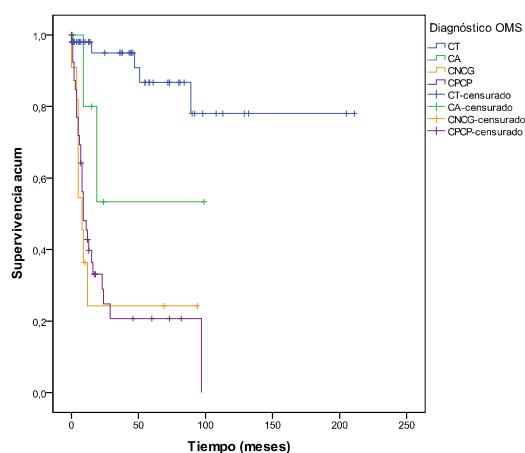
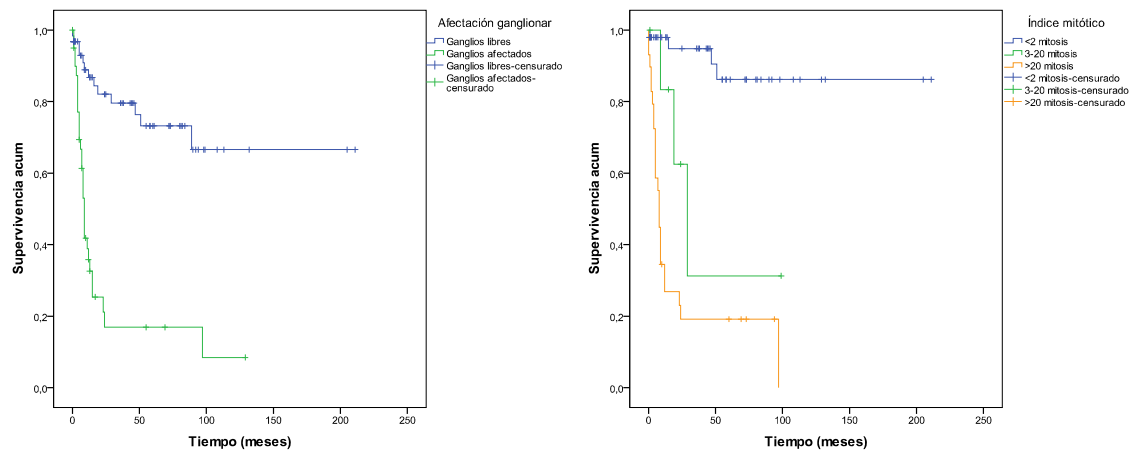


Figura 19: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo al diagnóstico

En cuanto a la afectación ganglionar y al índice mitótico, la tasa de supervivencia acumulada de los pacientes con ganglios libres era significativamente mayor que

aqueellos con ganglios afectados por el tumor [155 meses de media (SE:13) frente a 27 (SE:7); $p=0,0001$], así como en pacientes con índice mitótico de <2 mitosis por 10CGC [188 meses de media (SE:10)] de pacientes con 3-20 mitosis por 10 CGA [56 meses de media (SE:17)] frente a pacientes con >20 mitosis por 10CGA [24 meses de media (SE:7), $p=0,0001$] (Figuras 20 y 21).



Figuras 20 y 21: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de metástasis ganglionares y respecto al índice mitótico

De la misma manera, se observó que pacientes no fumadores mostraban una tasa de supervivencia acumulada mayor que los pacientes fumadores [185 meses de media (SE:14) frente a 48 (SE:7), ($p=0,0001$)] (Figura 22).

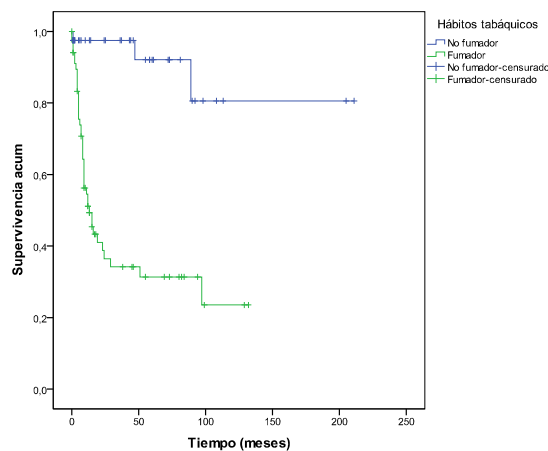
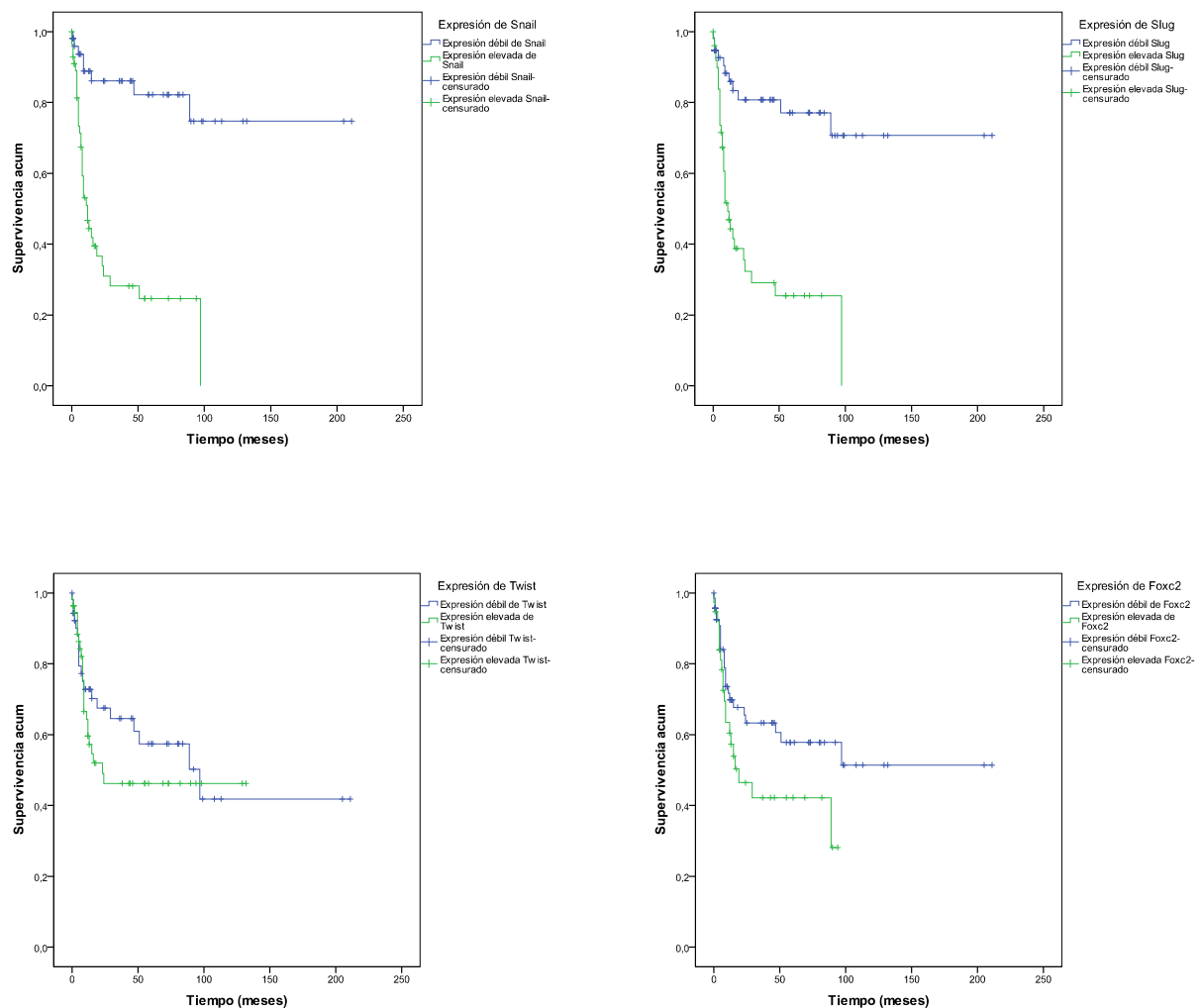


Figura 22: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo al consumo de tabaco

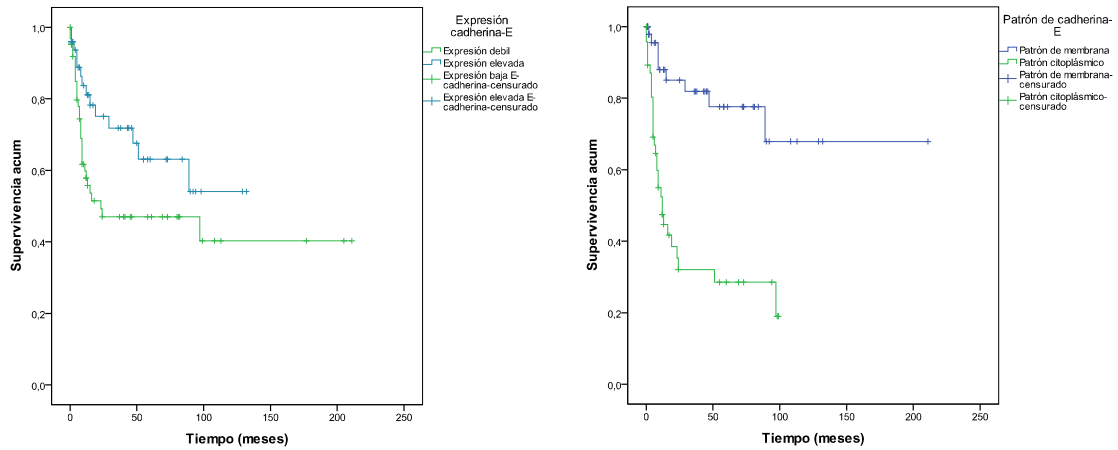
Estos resultados muestran que la serie de tumores estudiada se ajusta al comportamiento esperado desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, y apunta a que se trata de una serie representativa.

A continuación se analizó el impacto de los niveles de expresión proteica estudiados sobre los tiempos de supervivencia de los pacientes. Así, aquellos con expresión elevada de Snail1 ($p=0,0001$), Snail2 ($p=0,0001$) y Foxc2 ($p=0,039$) presentaron una tasa de supervivencia acumulada reducida; en cambio la expresión elevada de Twist ($p=0,304$) no afecta a la supervivencia de los pacientes con TNE de Pulmón (Figuras 23-26).

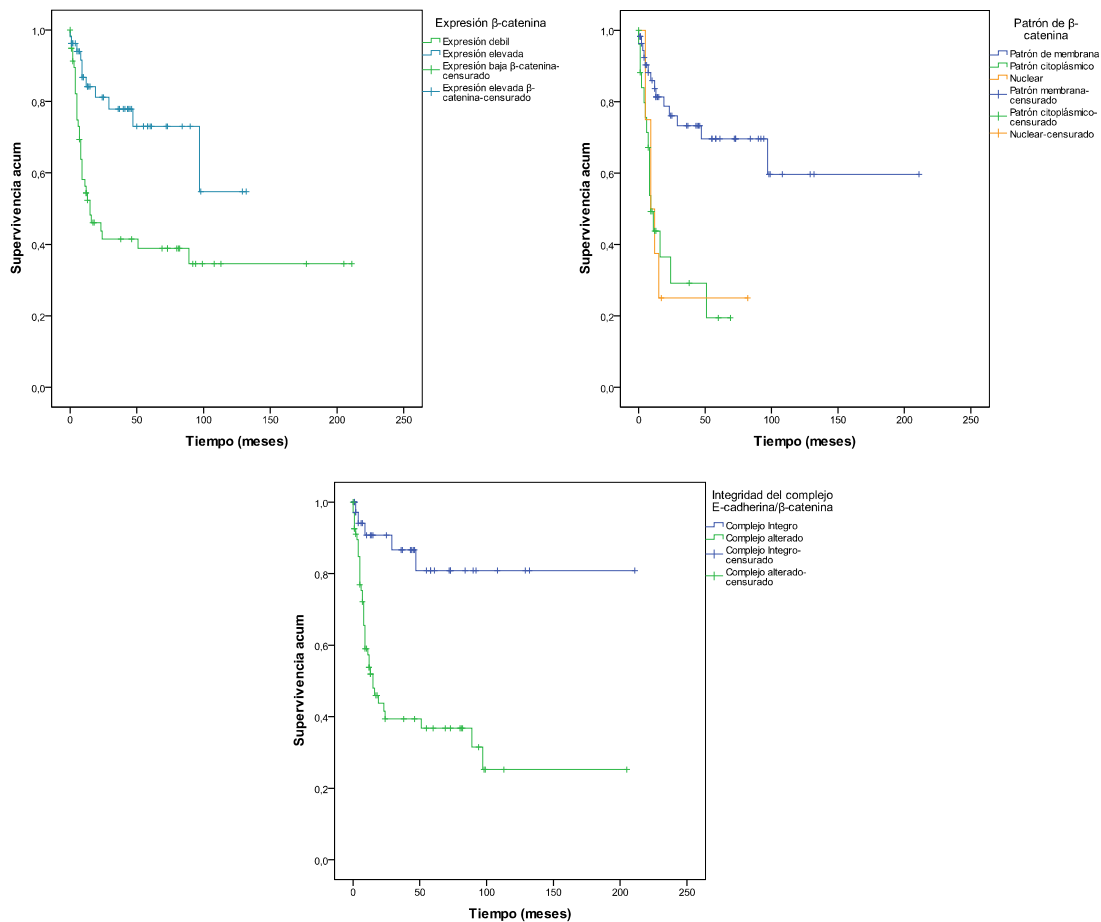


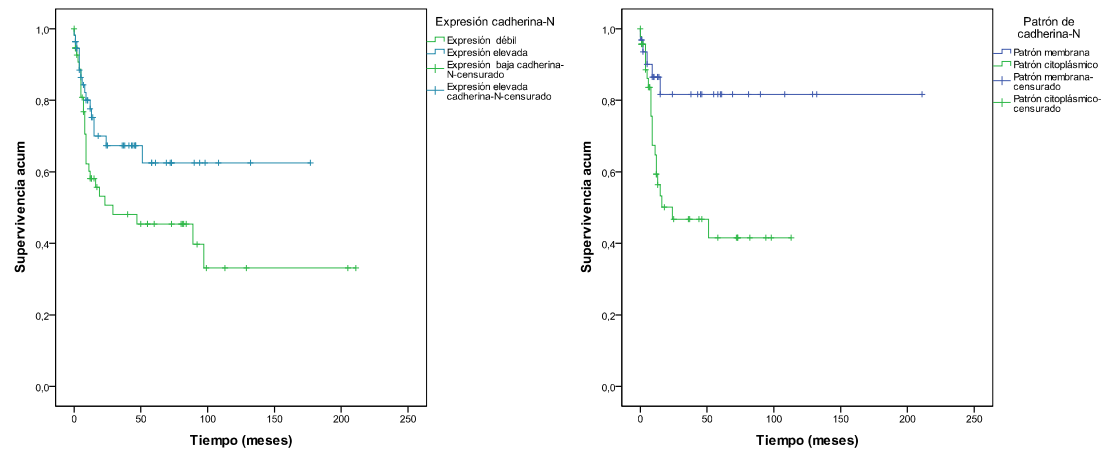
Figuras 23-26: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo con el nivel de expresión de Snail1, Snail2, Twist y Foxc2

Asimismo, la expresión reducida y deslocalizada de la membrana de cadherina-E, de cadherina-N, de β -catenina así como la alteración del complejo cadherina-E / β -catenina, afectaban a la supervivencia de los pacientes. (Figuras 27-33)



Figuras 27-28: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo con el nivel de expresión y patrón de cadherina-E





Figuras 29-33: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo con el nivel de expresión y patrón de β -Caterina, integridad del complejo cadh-E- β -cat, y nivel de expresión y patrón de cadherina-N

En la tabla 14 se recogen los datos de supervivencia de los pacientes atendiendo a las valoraciones moleculares.

Tabla 14						
Variable		Media (meses)	SE	IC (95%)	% 5 años	p
Expresión de cadherina-E	Débil	96	15	± 29	47	0,045
	Elevada	87	9	± 19	63,1	
Patrón de cadherina-E	Membrana	160	15	± 31	79,3	0,0001
	Citoplasma	36	6	± 13	28,5	
Expresión de β -catenina	Débil	83	14	± 27	39	0,001
	Elevada	95	9	± 19	73	
Patrón de β -catenina	Membrana	145	15	± 31	71	0,0001
	Citoplasma	24	6	± 12	19,5	
	Núcleo	27	11	± 22	25	
Integridad del complejo cad-E/ β -cat	Integro	177	14	± 28	82	0,0001
	Alterado	72	13	± 26	38,7	
Expresión de cadherina-N	Débil	87	15	± 30	45,4	0,052
	Elevada	116	12	± 25	62,5	
Patrón de cadherina-N	Membrana	176	14	± 28	83	0,005
	Citoplasma	84	14	± 27	43	
Expresión de	Débil	170	13	± 27	83,2	0,0001

Snail1	Elevada	34	6	±12	26,1	
Expresión de Snail2	Débil	161	13	±26	78	0,0001
	Elevada	35	6	±12	27	
Expresión de Twist	Débil	116	16	±32	60	0,304
	Elevada	68	9	±18	47	
Expresión de Foxc2	Débil	126	14	±27	60	0,039
	Elevada	45	7	±14	42	
Expresión de Vimentina	Negativo	109	12	±24	54	0,853
	Positivo	44	15	±29	44	

En el análisis multivariante de supervivencia (Cox) se incluyeron las siguientes variables, que resultaron significativas en análisis univariante (Kaplan-Meier): edad, diagnóstico, afectación ganglionar, índice mitótico y todas las variables moleculares. La única variable con valor pronóstico independiente fue el índice mitótico ($p=0,075$) confiriendo un riesgo 2,3 veces superior de muerte a causa del tumor.

5.1.7.1. Análisis de supervivencia de Carcinoides Típicos

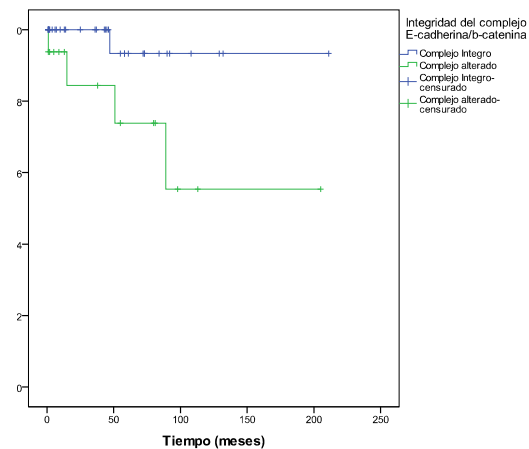
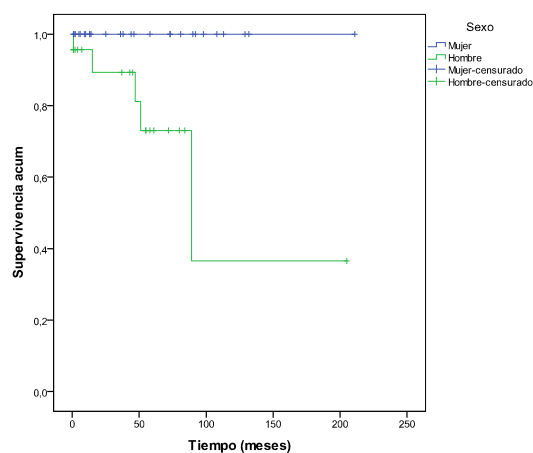
El seguimiento medio de esta serie de tumores fue de 106 meses (rango 14-242).

Tras observar el resultado de supervivencia en relación al diagnóstico, decidimos profundizar en el estudio de los casos con carcinoide típico (CT), cuya evolución es, en principio, más favorable que el resto de los grupos (tasa supervivencias a los 5 años de 90%). Sin embargo, la realidad clínica indica que algunos de estos casos muestran un curso desfavorable, sin que sea posible, en la actualidad, conocer a qué grupo pertenecerá un paciente concreto. Por ello, nos planteamos estudiar si alguna de las variables manejadas en este estudio era útil en la identificación del grupo de pacientes con carcinoide típico de peor pronóstico.

Se observaron diferencias en las tasas de supervivencias a los 5 y a los 10 años, en función del sexo ($p=0,006$) y de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina ($p=0,03$) (Figuras 34-35). Este resultado proporcionaría herramientas que podrían ayudar al clínico en la identificación de pacientes con CT de peor pronóstico, susceptibles de recibir tratamientos adicionales o de someterse a seguimientos más exhaustivos. Ninguna otra variable, anatomopatológica o molecular, permitió esta discriminación.

Tabla 15: Análisis de supervivencia a los 5 y 10 años de pacientes con carcinoides típicos, en base a las variables sexo e integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina.

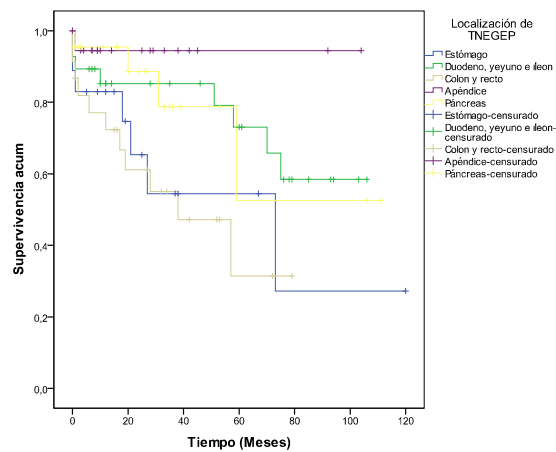
Tabla 15				
Supervivencia específica de enfermedad		5 años	10 años	p
Serie Carcinoides Típicos		87%	80 %	
Sexo	Mujer	100%	100%	0,006
	Hombre	75%	37%	
Complejo cad-E/ β -cat	Íntegro	94%	94%	0,03
	Alterado	75%	56%	



Figuras 34 y 35: Funciones de supervivencia en pacientes con carcinoides típicos, estratificando según el sexo y en función de la integridad del complejo cad-E/ β -cat.

5.2. ANÁLISIS DE LA SERIE DE TNE-GEP

La serie de TNE GEP constaba de 110 casos, distribuidos en las siguientes localizaciones anatómicas: estómago (18), intestino delgado (28), páncreas (22), colon y recto (23) y apéndice (19). Un análisis inicial de la supervivencia de estos pacientes, en función de la localización del tumor, mostró una clara diferencia entre los pacientes con TNE de apéndice frente al resto (Fig. 36), mostrando una tasa de supervivencia acumulada a los 5 años de 94,4%.



Figuras 36: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo a la localización del TNEGEP

Estas acusadas diferencias de pronóstico se podrían deber a:

La propia localización anatómica, que determina que los pacientes con TNE de apéndice cursen con clínica de apendicitis y sea posible una detección precoz del tumor.

Las características clínicopatológicas de estos tumores: en su mayoría son G1, presentan un tamaño <1 cm, menos de 2 mitosis x10 CGA y una expresión de ki67 menor del 2%. Estas observaciones podrían sugerir que la biología subyacente al desarrollo de los TNE de apéndice podría diferir de la del resto de TNE, motivo por el cual se decidió excluir estos casos de la serie y se estudiaron por separado. Con el fin de detectar variables moleculares (entre las planteadas en nuestro estudio) que pudieran contribuir a explicar estas diferencias biológicas sospechadas, los comparamos con los tumores de peor pronóstico según localización (colorrectal + estómago).

La tabla 16 recoge las correlaciones estadísticas observadas al comparar dichos grupos de TNE:

Tabla 16		
	TNE apéndice vs. TNE colon-recto+estómago p, test Chi-cuadrado (χ^2)	Observaciones TNE de apéndice
Edad	0,001	Más jóvenes
Diagnóstico OMS 2010	0,043	Carcinoides G1
Tamaño tumoral	0,011	Pequeño, < 3 cm
Índice mitótico	0,024	<2 mitosis x10 CGA

% Ki67	0,034	<2 %
Grado tumoral	0,021	G1
Diferenciación Histológica	0,007	Bien diferenciados
Estadio	0,033	Estadio I-II
Invasión vascular	0,037	No
Necrosis	0,036	No
Afectación ganglionar	0,036	No
Expresión de Snail1	0,0001	Negativos
Expresión de Snail2	0,048	Negativos
Expresión de Foxc2	0,0001	Negativos
Expresión de Cadherinas	0,001	Elevado

Como se observa, los TNE de apéndice están asociados a categorías clínico-patológicas favorables. Asimismo, las observaciones moleculares apuntan en el mismo sentido: son tumores que conservan la expresión de cadherina-E y no expresan marcadores propios de TEM o mesenquimales, lo cual podría contribuir a justificar su comportamiento biológico poco agresivo.

Por otro lado, consideramos la opción de realizar el análisis de los TNE de forma independiente según su localización. Sin embargo, ésta quedó excluida debido al número de casos en cada serie, no suficiente como para extraer conclusiones estadísticamente robustas.

A continuación se describen los resultados obtenidos del análisis de la serie de TNE GEP, una vez excluidos los de apéndice (N = 91).

5.2.1. Análisis inmunohistoquímico en el epitelio intestinal sano

Tal y como se observó en el epitelio respiratorio, la inmunotinción de cadherina-E (Fig. 37-A) y de β -Catenina (Fig. 37-B), se detectaba en la membrana con patrón lineal, ya que ambas forman parte del complejo cadherina-E- β -catenina, indispensable en el mantenimiento de la homeostasis tisular.

Para todos los represores transcripcionales se detectó señal nuclear nula (Snail1-Fig 37-D; Snail2-Fig. 37-E; Twist-Fig 37-F, Foxc2-Fig 37-G) así como para la cadherina-N como para Vimentina (Fig. 37 H-I respectivamente).

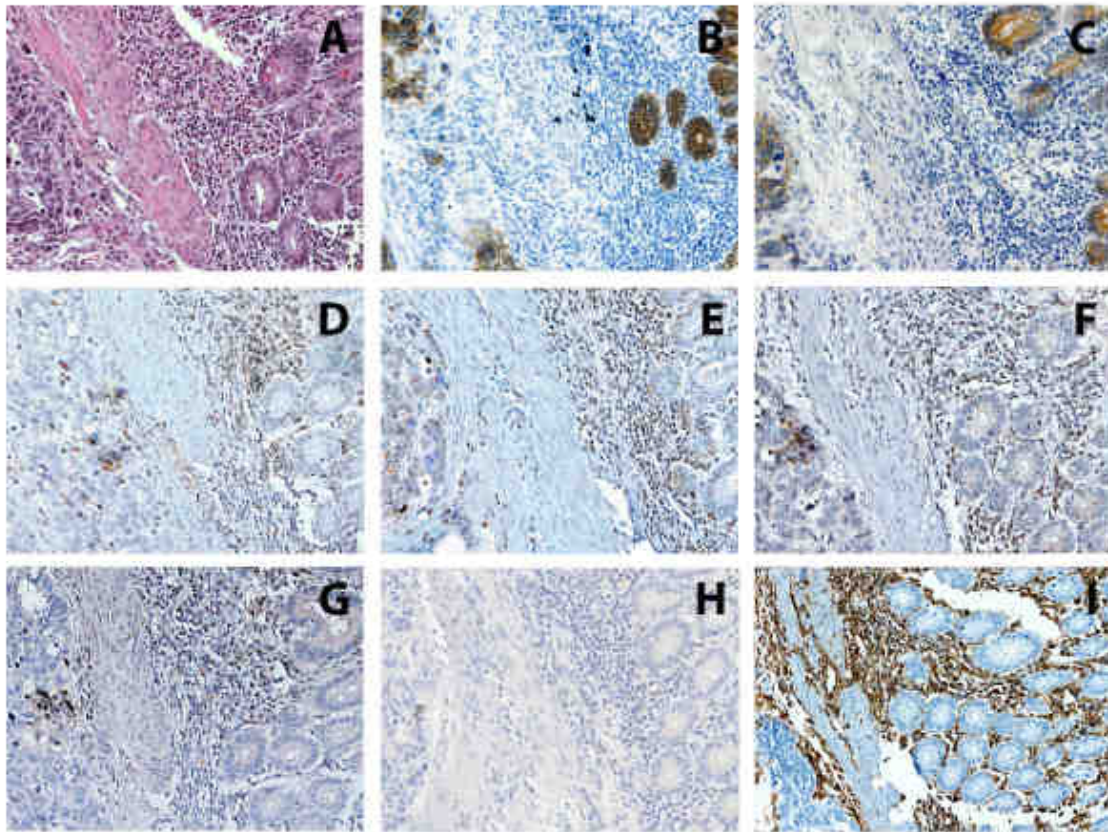


Figura 37: Expresión de marcadores implicados en TEM, en el epitelio intestinal sano

5.2.2. Frecuencias de las valoraciones moleculares en los TNE GEP

Una vez realizado el análisis inmunohistoquímico, se obtuvieron las siguientes frecuencias para cada marcador en la serie de TNE GEP (Tabla 17).

Tabla 17		
		Frecuencias (%)
Expresión cadherina-E	Débil	48 (52,7)
	Elevado	43 (47,3)
Patrón cadherina-E	Membrana	70 (76,9)
	Citoplasma	17 (18,7)
Expresión β -catenina	Débil	45 (49,5)
	Elevado	46 (50,5)
Patrón β -catenina	Membrana	60 (65,9)
	Citoplasma	7 (7,7)
	Núcleo	7 (7,7)
Integridad del complejo cadh-E/ β -cat.	Íntegro	52 (57,1)
	Alterado	37 (40,7)
Expresión	Débil	30 (33)

cadherina-N	Elevado	61 (67)
Patrón cadherina-N	Membrana	8 (8,8)
	Citoplasma	18 (19,8)
Expresión Snail1	Negativo	45 (49,5)
	Positivo	45 (49,5)
Expresión Snail2	Negativo	51 (56)
	Positivo	40 (44)
Expresión Twist	Negativo	48 (52,7)
	Positivo	43 (47,3)
Expresión Foxc2	Negativo	39 (42,9)
	Positivo	52 (57,1)
Expresión Vimentina	Negativo	81 (89)
	Positivo	10 (11)

5.2.3. Asociación entre las variables clínico-patológicas y valoraciones moleculares en TNE GEP

De todos los tumores, los TNE G3 (Célula grande y Célula pequeña) presentaron las siguientes alteraciones en la expresión IHQ de los marcadores de TEM, con mayor frecuencia que los TNE G1 y G2: patrón citoplásmico de cadherina-E ($p=0,001$), expresión débil de β -catenina ($p=0,038$), así como expresión elevada de Foxc2 ($p=0,015$) y una tendencia con nivel elevado de Snail1 ($p=0,076$). (Figura 38 y 39)

Con respecto a la localización anatómica, cabe destacar la diferencia observada en cuanto a la expresión de Snail1, Snail2 y Foxc2 en tumores de intestino delgado, que fue débil en la mayoría de los casos, frente a la expresión de dichos marcadores en tumores de estómago, colon-rectal y páncreas ($p<0,05$ para las tres proteínas). Estos resultados concuerdan con la supervivencia más favorable encontrada para el subconjunto de pacientes con TNE de intestino (Ver figura 36).

La presencia de necrosis y el grado tumoral se asociaban a patrón citoplásmico de cadherina-E ($p=0,047$, $p=0,001$, respectivamente), expresión débil de cadherina-N ($p=0,004$, $p=0,003$, respectivamente), expresión elevada de Snail1 ($p=0,043$, $p=0,035$, respectivamente), y expresión elevada de Foxc2 ($p=0,004$, $p=0,005$, respectivamente).

En esta serie, al igual que en la de TNE de pulmón, no se observó un cambio en el patrón de expresión de cadherinas. Al contrario, cabe destacar la asociación de la expresión elevada de cadherina-N con las categorías favorables de las siguientes variables clínico-patológicas: necrosis –ausencia- ($p=0,004$) y grado -G1- ($p=0,0001$).

Por otro lado, la localización citoplasmática de cadherina-N se asocia con ausencia de afectación ganglionar ($p=0,04$) y estadios tempranos, I-II ($p=0,049$).

Los tumores de los pacientes con hábito alcohólico mostraban alteración del complejo cadherina-E/ β -catenina ($p=0,01$).

En la tabla 8.3 del ANEXO se recogen las correlaciones estadísticas entre todas las variables estudiadas.

Figuras 38 y 39 muestran la expresión de los marcadores implicados en TEM en los subtipos tumorales en TNE de pulmón.

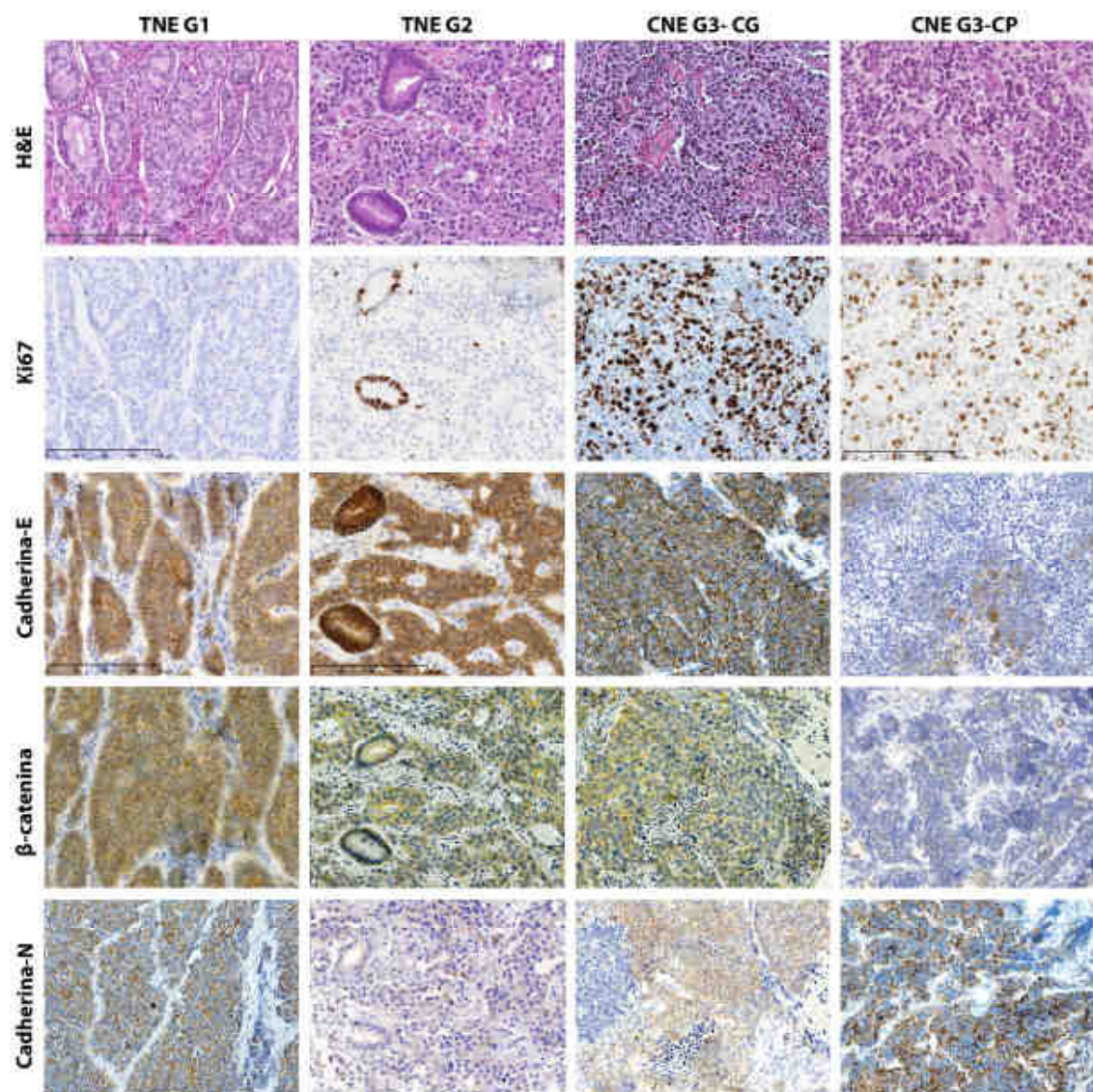


Figura 38: H&E, Ki67, expresión IHQ de cadherina-E, de β -catenina y cadherina-N en los subtipos tumorales de TNEGEP

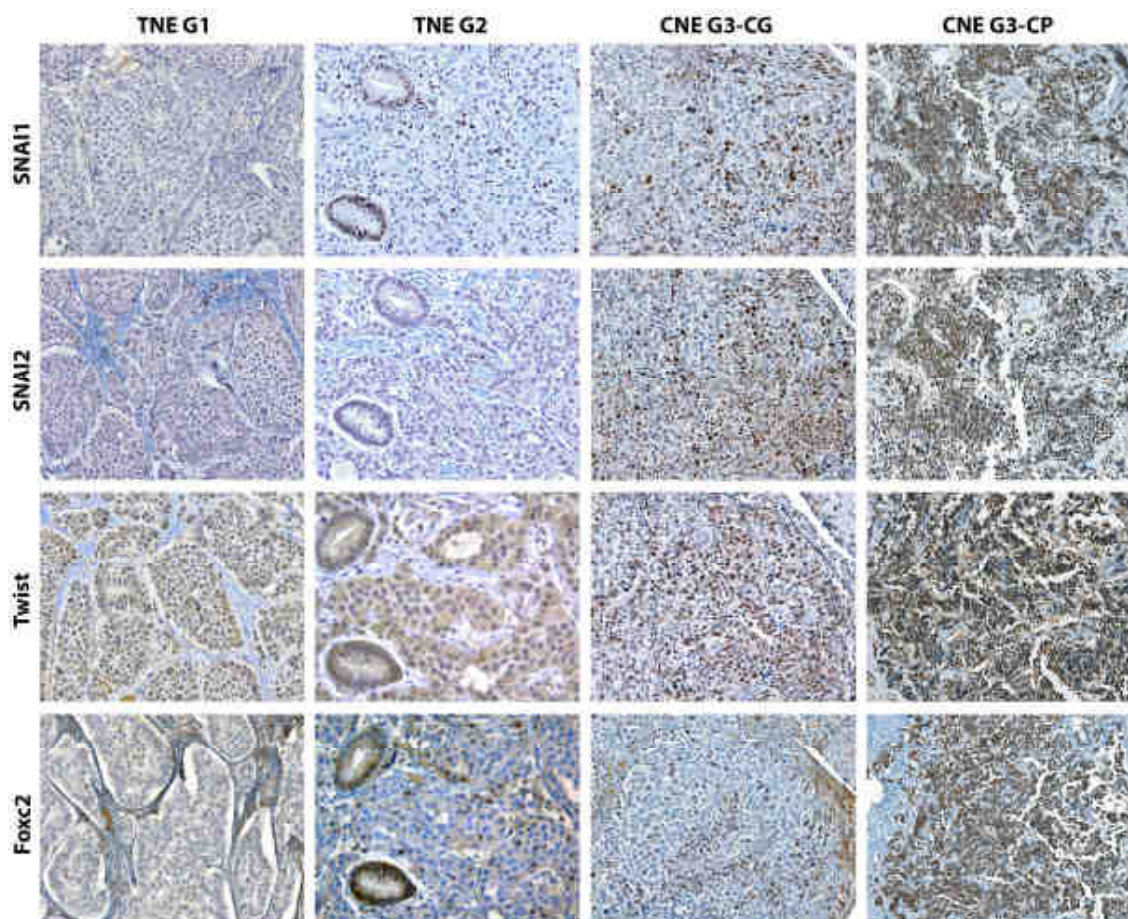


Figura 39: Expresión IHQ de Snail1, Snail2, Twist1 y Foxc2 en los subtipos tumorales de TNEGEP

5.2.3.1. Diagnóstico diferencial entre subtipos tumorales de TNEGEP

Al igual que en la serie de TNE de pulmón, se establecieron comparaciones de cada variable molecular estudiada sobre los grupos de interés en TNEGEP (TNEG1 vs TNEG2 y CNEG3-CG vs CNEG3-CP) con el fin de encontrar variables moleculares que discriminasen entre subtipos tumorales.

1. Ninguna de las variables consideradas permitía discriminar los TNEG1 vs. TNEG2
2. En cuanto a las variables que permitieron diferenciar a CNEG3-CG vs. CNEG3-CP: se encontraron diferencias significativas de la expresión débil de β -catenina y de cadherina-N más frecuentes en los CNEG3-CP que en los CNEG3-CG. ($p=0,009$ y $p=0,002$ respectivamente).

5.2.4. Asociaciones entre las valoraciones moleculares en TNE GEP

Entre las variables moleculares analizadas en la serie de TNEGEP, hay que destacar que no se observó asociación entre los niveles de expresión de Snail1 y cadherina-E, aunque sí entre la expresión elevada del represor y la localización

citoplasmática de la cadherina-E ($p=0001$) y, por tanto, con la pérdida de la integridad del complejo con β -catenina ($p=0,028$).

Cabe destacar también que la expresión elevada de cadherina-N se asociaba con la preservación de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina ($p=0,04$).

Aunque no se observó el cambio de patrón de expresión de cadherinas, sí se observó asociación del nivel elevado de Twist, inductor del cambio, con la expresión elevada de cadherina-N ($p=0,021$) y con su presencia en la membrana ($p=0,007$).

Los niveles de expresión de Foxc2 se asociaban con niveles elevados de Snail1 ($p=0,0001$), Snail2 ($p=0,002$) y Twist ($p=0,001$).

En la tabla 8.4 del ANEXO se recogen las correlaciones estadísticas entre todas las variables moleculares consideradas.

5.2.5. Análisis de supervivencia en TNE GEP

En esta serie, el tiempo de seguimiento medio fue de 58 meses (rango 1-130) y la tasa de supervivencia acumulada a los cinco años fue del 56,8%. (Figura 40)

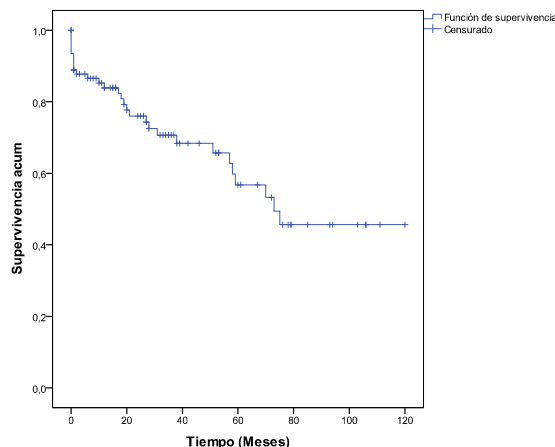
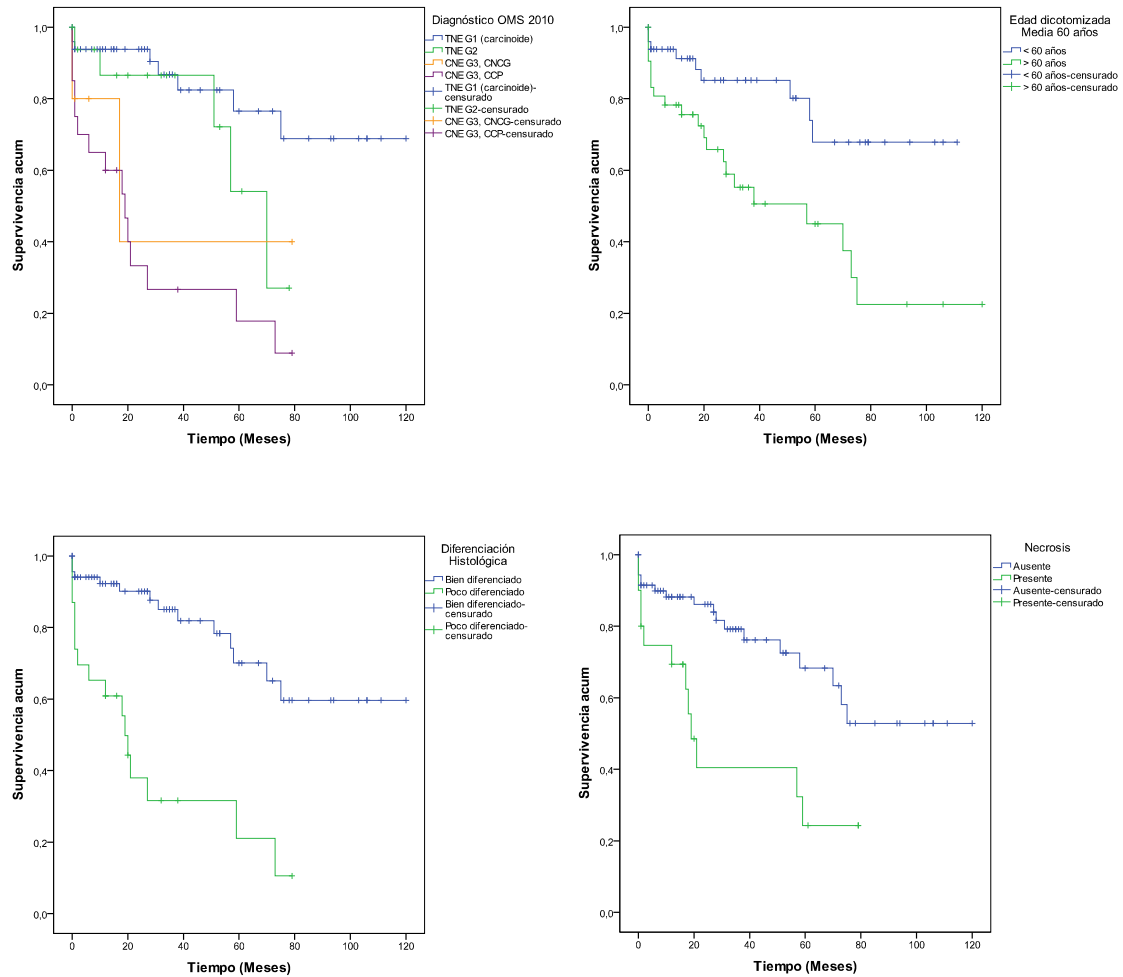


Figura 40: Análisis Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de la población global en función del tiempo (meses)

Las figuras 41-44 muestran las curvas de supervivencia de la serie TNE GEP estratificadas según las siguientes variables clínico-patológicas: diagnóstico, edad, necrosis, diferenciación histológica. De todas las variables analizadas se omiten las gráficas de supervivencia respecto al grado, índice mitótico y %ki67 puesto que van implícitas en la variable Diagnóstico.

Los valores de supervivencia a los cinco años correspondientes a las diferentes categorías se recogen en la Tabla 18. Aunque estos resultados no aportan información

novedosa, sí que son útiles como reflejo del ajuste de la serie en estudio al comportamiento esperado desde el punto de vista clínico.

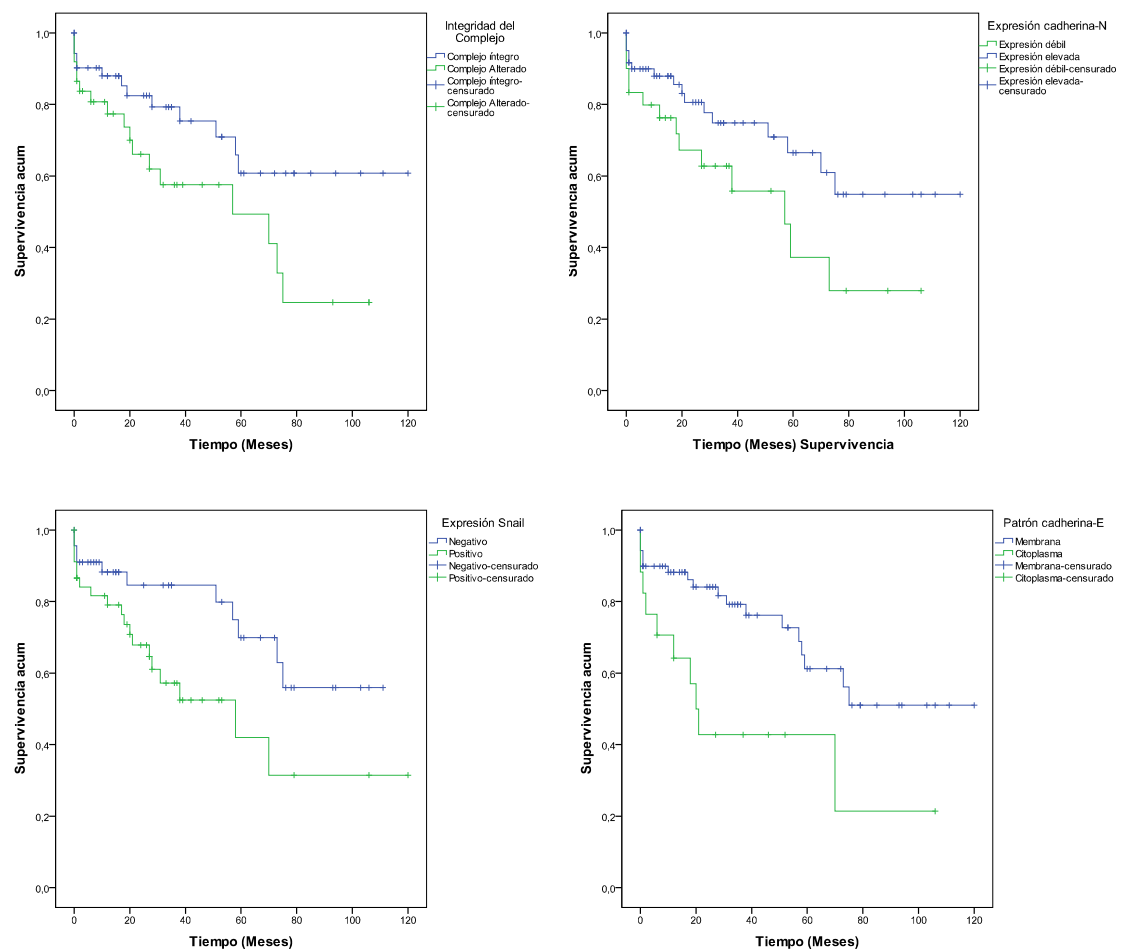


Figuras 41-44: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo al diagnóstico, edad, diferenciación histológica y presencia o ausencia de necrosis

Tabla 18: Variables clínico-patológicas que afectan a la supervivencia de pacientes con TNEGEP.						
Variable		Media (meses)	SE	IC (95%)	Sup acum a los 5 años (%)	p
Diagnóstico	TNE G1	96	7	±15	76,5	0,0001
	TNE G2	58	6	±13	54	
	CNEG3-CG	38	19	±38	40	
	CNEG3-CP	27	7	±13	17,8	
Edad	<60	86	7	±14	67,8	0,002
	>60	54	8	±16	45	
Grado tumoral	G1	95	7	±15	76,5	0,0001
	G2	58	6	±13	54	
	G3	29	6	±13	21,5	

Índice mitótico	<2	94	7	±14	75	0,0001
	3-20	55	7	±14	45,2	
	>20	21	7	±13	16,1	
% Ki67	<2	93	7	±15	72	0,0001
	2-20	57	7	±14	63	
	>20	30	7	±13	23	
Diferenciación	BD	89	7	±13	70,1	0,0001
	PD	29	6	±13	21,1	
Necrosis	(-)	83	7	±14	68	0,002
	(+)	35	8	±15	24	

En cuanto a las variables moleculares derivadas de la determinación de la expresión proteica, cabe destacar el nivel elevado de Snail1 ($p=0,023$), la pérdida de integridad del complejo ($p=0,039$), el patrón citoplasmático de cadherina-E ($p=0,005$) y la expresión reducida de cadherina-N ($p=0,055$) tienen un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes (Tabla 19) (Figuras 45-48).



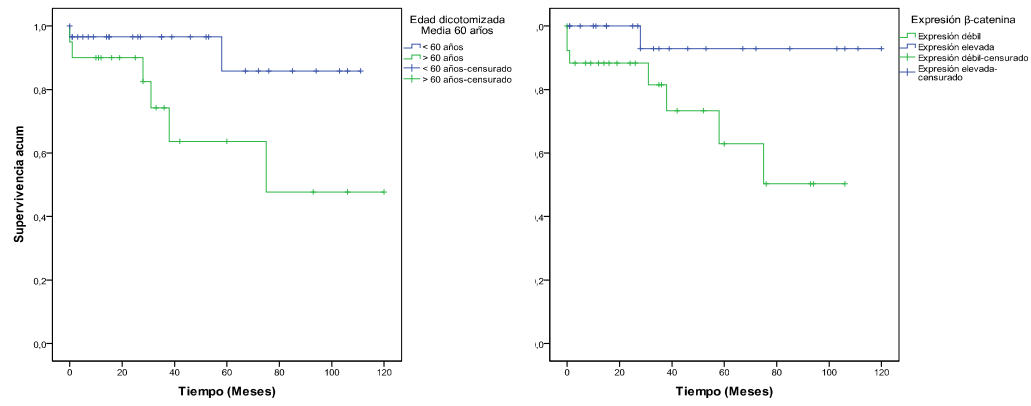
Figuras 45-48: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes de acuerdo a la integridad del complejo cadherina-E- β -catenina, expresión de cadherina-N, expresión de Snail y patrón de cadherina-E

Tabla 19: Variables IHQ que afectan a la supervivencia de los pacientes con TNEGEP						
Variable		Media (meses)	SE	IC (95%)	Sup acum a los 5 años (%)	p
Integridad del complejo cad-E/ β -cat	Int	85	8	± 16	60,8	0,039
	Alt	54	8	± 15	49,3	
Expresión de cadherina-N	D	53	9	± 17	37,2	0,055
	E	82	7	± 15	66,5	
Patrón de cadherina-E	M	81	7	± 14	61,2	0,005
	C	43	11	± 22	42,8	
Expresión de Snail1	D	82	7	± 14	70	0,023
	E	59	9	± 19	42	

En el análisis multivariante de supervivencia (Cox) en la que se incluyeron las variables significativas en el análisis Kaplan Meier, tales como, edad, índice mitótico, %Ki67, grado tumoral, diferenciación histológica y todas las variables moleculares, mostró que las únicas variables con valor pronóstico independiente eran el índice mitótico, con riesgo de muerte por enfermedad 2,6 veces superior, y la expresión de Snail1, con un riesgo de muerte por enfermedad 2,17 veces superior ($p=0,0001$ y $p=0,054$, respectivamente).

5.2.5.1. Diferencias en la supervivencia entre Carcinoides TNE G1

Los TNE G1 muestran la particularidad de que el grado de diferenciación histológica no se correlaciona con la invasión tumoral y metástasis. Dado que constituían un grupo numeroso en esta serie TNEGEP ($N=49$), lo sometimos a análisis de supervivencia, con el fin de identificar alguna variable que tuviese impacto en el curso de la enfermedad. De todas las incluidas en el análisis univariante, la edad inferior a 60 años ($p=0,041$) y el nivel de expresión elevada de β -catenina ($p=0,037$) fueron las únicas variables que identificaban subgrupos de pacientes con mejores tasas de supervivencia (Figuras 49-50). Del análisis multivariante, se observó una tendencia en la expresión elevada de β -catenina con valor pronóstico independiente, con un riesgo 6,8 veces superior ($p=0,073$).



Figuras 49-50: Funciones de supervivencia, estratificando los pacientes con TNE G1, de acuerdo a la edad y expresión de β -Catenina

6. DISCUSIÓN

Los tumores neuroendocinos (TNEs) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias poco frecuentes, cuya incidencia ha aumentado en los últimos 30 años. Presentan una localización variada en el organismo, a lo largo de las mucosas de origen endodérmico, así como variados grados de malignidad. En muchas ocasiones es difícil establecer este potencial de malignidad, sobretodo en los TNEGEP, ya que no se observa una correlación entre la diferenciación histológica del tumor y su agresividad desde el punto de vista clínico. En el caso de los TNEs de pulmón, sí existe una correlación clara entre los hallazgos histológicos y el potencial de malignidad. Estas observaciones podrían ser reflejo de una compleja biología, que determinaría el escaso conocimiento alcanzado hasta la fecha de las bases moleculares subyacentes a su desarrollo.

Nuestro trabajo en los últimos años se ha centrado en el estudio del proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) en estas neoplasias. Las TEM se producen en el organismo de forma fisiológica, siendo imprescindibles en el desarrollo embrionario y la curación de heridas. Su activación patológica, durante la carcinogénesis, favorece la invasión tumoral que inicia el proceso de metástasis.

Aunque son numerosos los estudios centrados en el papel de la TEM en invasión tumoral, buena parte de ellos abordan la cuestión con estrategias *in vitro*, de utilidad indiscutible para el avance del conocimiento. Nuestro trabajo cuenta con el valor añadido de basarse en el estudio de series representativas con un número significativo de muestras humanas, lo cual permite detectar la existencia de parámetros, bien anatomopatológicos o moleculares, con potencial aplicación en el ámbito clínico (con valor diagnóstico y/o pronóstico).

En los últimos años, estudios previos han puesto de manifiesto que durante los primeros pasos de invasión tumoral se produce la alteración del complejo de adhesión intercelular cadherina-E/ β -catenina^{143, 223, 224}, implicado en el mantenimiento de la integridad de los epitelios sanos. Uno de nuestros objetivos perseguía comprobar si la integridad de dicho complejo se perdía en los TNEs de pulmón y GEPs, así como la posible contribución de los represores transcripcionales del gen cadherina-E en esta alteración, con el fin de esclarecer el mecanismo de invasión utilizado por estas neoplasias.

Para ello, en primer lugar valoramos la expresión de estas moléculas en los tejidos normales, observando que el complejo cadherina-E- β -catenina presentaba una distribución de membrana tanto en el epitelio respiratorio como intestinal, con un patrón lineal y un nivel de expresión elevado para ambas moléculas. Esta observación es compatible con la función de dicho complejo en la mediación de las uniones adherentes intercelulares y en el mantenimiento de la integridad de los epitelios²²⁵.

Con el fin de determinar la importancia de la preservación de la integridad del complejo cadherina-E- β -catenina en la membrana de los tumores, se dividieron los casos en dos grupos: aquellos que retenían la expresión de los dos componentes en la membrana, y aquellos en los que al menos uno de ellos estaba ausente. Así, la integridad se perdía en el 62% de los TNE de pulmón. Además en esta serie, se observaba una asociación significativa de esta alteración con variables clínicas desfavorables (ganglios afectados, índice mitótico elevado, presencia de necrosis y consumo de tabaco). Estos resultados difieren de los descritos por Clavel y col²²⁶, quienes no encontraron correlación entre la expresión del complejo con parámetros histopatológicos, probablemente debido al número limitado de casos.

La pérdida de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina fue menos frecuente en la serie de TNEGEP (43% de los casos) y no se observó asociación con ninguna variable clínico-patológica, salvo con el consumo de alcohol, observación descrita también por el grupo de Wang y col.²²⁷ Tan solo el patrón citoplásmico de cadherina-E se asoció significativamente con los tumores de alto grado (CNE G3 de Célula grande y pequeña), resultados acordes a Kawahara y col.²²⁸

Estos resultados sugerirían que la alteración del complejo podría contribuir de forma diferencial al desarrollo y agresividad de los TNE de localización diversa (pulmón vs GEP).

Muchos autores han puesto de manifiesto la asociación entre la expresión y/o función de la cadherina-E y la capacidad invasiva de los tumores, proponiendo al gen *CDHI* como supresor de invasión^{142, 143}. En nuestro estudio, comprobamos que los pacientes con TNE de pulmón con niveles reducidos de cadherina-E, mostraban afectación ganglionar con mayor frecuencia que los que presentaban niveles elevados. Análogamente, los pacientes sin cadherina-E en la membrana, presentaban también ganglios afectados con mayor frecuencia que los que mantenían el patrón de membrana de cadherina-E. Estos resultados, junto con los descritos por Salon y col.²²⁹ y Pelosi y

col.²³⁰ en series de TNE de pulmón, apoyan la idea de la función del gen de *CDHI* como gen supresor de invasión en este tipo de tumor.

A diferencia de estos resultados encontrados en la serie de TNE de pulmón, en la de TNEGEP ni la expresión débil de cadherina-E ni un patrón deslocalizado de la membrana se asociaron con afectación ganglionar.

Un hallazgo común en ambas series de TNE, fue la inexistencia del llamado “*switch*” de cadherinas (definido como el aumento de expresión de cadherina-N, con o sin reducción de cadherina-E), un proceso también descrito en el desarrollo embrionario, así como en los procesos de carcinogénesis y metástasis de otros tipos tumorales como mama, próstata, vejiga, melanoma^{199, 201}. Nuestros resultados muestran que la expresión de cadherina-N no aumenta con la malignidad del tumor, sino que tiende a disminuir, en paralelo a la cadherina-E (de forma significativa en la serie GEP). Resultados semejantes se han descrito para osteosarcomas²³¹, en los cuales niveles elevados de cadherina-N se asocian con inhibición de la migración celular y metástasis. Otro equipo observó que los niveles de cadherina-N eran independientes de la malignidad tumoral en astrocitomas, aunque sí parecía facilitar la diseminación de los tumores recidivantes.²³²

Es decir, nuestros resultados reflejan que los niveles elevados de ambas cadherinas se observan con mayor frecuencia en los tumores de bajo potencial de malignidad y con variables clínicas favorables. Resultados en el mismo sentido han sido descritos por Zynger y col.²³³ en TNE de pulmón.

Con el propósito de profundizar en el conocimiento de los sucesos moleculares asociados a la pérdida de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina en los TNEs, decidimos valorar la expresión de los factores de transcripción responsables de reprimir el gen de cadherina-E y, por tanto, de favorecer el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima. Estos factores de transcripción, Snail1, Snail2, Twist y Foxc2, han sido ampliamente estudiados en los últimos años después de que se descubriera su participación, tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, en la progresión de muchos tipos tumorales. Nuestro grupo publicó en el año 2010, por primera vez, la participación de Snail en la malignización de TNE de pulmón¹⁸⁵ y son pocos los trabajos que han revelado la participación de estos factores en los TNEGEP.

Conviene apuntar algunas limitaciones de los resultados publicados, algunos de los cuales proceden de una valoración inadecuada de la señal obtenida tras la

inmunotinción. En concreto, hay trabajos que solo han tenido en cuenta la tinción citoplásmica de estos factores, incompatible con la localización fisiológica de estas proteínas. Entre los estudios que verdaderamente han valorado la presencia de Snail1 en el núcleo, mediante el uso de anticuerpos específicos, destacan aquellos en tumores de mama¹⁷⁶, melanoma²³⁴, colon¹⁷⁸, fibrosarcomas¹⁸³ y en cáncer gastrointestinal¹⁸⁰.

En el presente estudio comprobamos que los tejidos normales de epitelio respiratorio e intestinal, la inmunotinción para estos factores resultó negativa. Sin embargo, observamos que las células de los TNE de pulmón expresaban Snail1 y Snail2, y dicha expresión mostraba un patrón inverso respecto a la expresión de cadherina-E, lo cual es compatible con el papel descrito para Snail1 y Snail2 como represores transcripcionales de la cadherina-E. No se observó lo mismo para la expresión de Twist ni de Foxc2. Además, en los casos con niveles elevados de Snail1 y Snail2 se observaba una pérdida de la integridad del complejo cadherina-E- β -catenina en la membrana, con aumento en la expresión la proteína mesenquimal vimentina, tal y como describen Kokkinos y col. y Satelli y col. en estudios *in vitro* e *in vivo*^{235, 236}.

Respecto a la afectación ganglionar, es importante destacar que también observamos niveles elevados de Snail1, Snail2, Twist, Foxc2, y Vimentina con mayor frecuencia en los pacientes con ganglios metastáticos tal como se ha correlacionado en varios estudios^{158, 176, 197, 237}. Estos resultados apoyan el modelo según el cual se propone a Twist como desencadenante directo de la intravasación y a Foxc2 como encargado del mantenimiento del fenotipo mesenquimal, mientras que Snail1 y Snail2 intervendrían como desencadenantes del proceso de TEM, reprimiendo directamente el gen de cadherina-E^{194 179 156}.

Cabe destacar que estas observaciones no se constataron en los TNEGEP. En estos tumores, de los cuatro factores de transcripción implicados en TEM, solo la expresión elevada de Snail1 se asoció con el patrón citoplásmico de cadherina-E tal y como describió también el grupo de Fendrich y col.¹⁸⁴. Además, en estos tumores se observó una correlación entre los niveles de Twist y de cadherina-N, así como con su localización en el citoplasma, lo cual concuerda con el papel descrito para Twist como inductor directo de cadherina-N²⁰⁰. Estas relaciones no se presentan en los TNE de pulmón.

Foxc2 fue el único de los factores de transcripción cuya expresión elevada se asoció con el potencial de malignidad, siendo mas frecuentes en los CNE G3.

En cuanto a la localización anatómica, cabe destacar el diferente patrón de expresión de estos factores de transcripción en los TNE de intestino (expresión reducida), en comparación con los de estómago, colonrecto y páncreas.

La dificultad técnica de disponer de ARNm de alta calidad para los TNEGEP limitó el abordaje de la valoración de los niveles de expresión de ARNm a la serie de tumores de pulmón.

Tras el análisis de los niveles de ARNm en el tejido tumoral vs tejido normal de pulmón, observamos que, sorprendentemente, los niveles de ARNm de los diferentes marcadores de TEM fueron en general superiores en el tejido normal que en el tumoral, datos contrarios a los hallazgos obtenidos por IHQ. Estos resultados se podrían deber, al menos en parte, a la presencia del abundante infiltrado inflamatorio en las muestras normales de pulmón, en las que había un predominio en macrófagos activos – que forman parte del lisado tisular sometido al análisis de RT-PCR cuantitativa -. Con las técnicas de colocalización visualizamos la expresión de Snail1 en los macrófagos activos, tal y como se ha demostrado recientemente por Hotz y col²³⁸. Además, no debemos olvidar que en los tumores, la expresión de Snail1 es transitoria y localizada en los frentes de invasión. Estas consideraciones podrían explicar ese aumento de señal de ARNm en los tejidos normales respecto a los tumorales.

Al comparar los niveles de ARNm y proteína de cada marcador, los resultados mostraron que los niveles de ARNm tanto para *SNAI1*, *FOXC2* y *TWIST1* eran semejantes en los tumores que expresaban niveles bajos y altos de las correspondientes proteínas, hecho que sería compatible con una regulación a nivel posttranscripcional de los mismos, mecanismo descrito recientemente¹⁶⁹. Algo similar se constató para el nivel de ARNm de *CDH1*, que era independiente del nivel de la proteína cadherina-E. Este resultado también sería compatible con la existencia de mecanismos posttranscripcionales y/o posttraduccionales que afectarían a la estabilidad de la proteína y, como consecuencia, a la estabilidad del complejo con β -catenina. Estudios *in vitro*, han descrito que las fosforilaciones de residuos Tyr de cadherina-E provocan la pérdida de los contactos intercelulares en células MDCK y A431 (utilizando inhibidores de tirosina-fosfatasa²³⁹, estimulando la fosforilación en Tyr, por activación de quinasas de la familia Src y varios receptores de factores de crecimiento^{240, 241} así como por fosforilaciones por CK2²⁴²). También se han descrito N- y O-glicosilaciones de la molécula, que favorecerían su acumulación en el citoplasma^{243, 244}.

El hecho de haber encontrado indicios de una hipotética contribución de regulación posttranscripcional de *CDHI* a la malignidad de los TNE de pulmón, es compatible con la existencia de regulación transcripcional de *CDHI* que se produce en las TEM, de manera que ambos niveles de regulación no serían excluyentes, sino que se sumarían para justificar la pérdida de expresión de cadherina-E asociada a malignidad. No hay que olvidar que TEM es un proceso muy dinámico en el tiempo y de localización puntual en la masa tumoral (en el frente invasivo). También conviene apuntar que estos resultados, derivados del análisis de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa deben ser considerados con cautela, debido a la “contaminación” de las muestras con el infiltrado inflamatorio.

De estos resultados también se puede concluir que se hace imprescindible la aplicación de técnicas IHQ en los estudios de TEM, ya que permiten la identificación y localización proteica en el frente invasivo.

Con el fin de encontrar variables moleculares que discriminasen distintos subtipos tumorales, facilitando el diagnóstico anatomopatológico, se compararon los resultados de expresión proteica en tumores CT vs CA y en CNCG vs CPCP en la serie de TNE de pulmón, así como en TNE G1 vs TNE G2 y en CNE G3 de célula grande vs célula pequeña en la serie de TNEGEP.

Entre las variables que discriminaron CT vs CA cabe destacar los patrones citoplásmicos de cadherina-E y β -catenina (así como la alteración de la integridad del complejo) más frecuentes en CA que en CT. Los niveles bajos de expresión de ambas moléculas, así como la expresión elevada de Snail1, Snail2 y Twist, resultaron más frecuentes en CPCP vs. CNCG, por lo que la detección inmunohistoquímica de todos estos marcadores podría tener un valor en el diagnóstico diferencial de los mencionados subtipos tumorales.

En cuanto a los TNEGEP, la expresión débil de cadherina-N y de nuevo de β -catenina discriminaba entre CNE G3 de Célula Grande vs CNE G3 de Célula Pequeña. Este resultado es novedoso y aporta una información molecular no descrita hasta la fecha.

Estos resultados resaltan la importancia práctica de β -catenina como un marcador molecular que discriminaría entre subtipos de TNE tanto de pulmón como GEP.

Respecto al análisis de supervivencia de pacientes con TNE de pulmón, las variables clínico-patológicas que tuvieron impacto sobre la supervivencia de los

pacientes fueron la edad, índice mitótico, afectación ganglionar y el consumo tabaco y todas las variables moleculares. Esta observación ya ha sido descrita en trabajos previos de esófago²⁴⁵, vejiga²⁴⁶, gástricos²⁴⁷, así como en tumores de célula no pequeña²⁴⁸⁻²⁵². Del análisis multivariante, el índice mitótico fue la única variable con valor pronóstico independiente.

El subconjunto de casos con diagnóstico de CT atrajo especialmente nuestra atención. Se trata de un grupo de tumores cuya evolución es imprevisible, con algunos casos que presentan características anatomopatológicas favorables y un curso clínico desfavorable. Por ello, intentamos detectar alguna variable que permitiese identificar a los pacientes con curso clínico adverso, es decir, con supervivencia reducida. Para ello, valoramos el impacto que tenían los parámetros clínicopatológicos, así como las alteraciones moleculares estudiadas en las tasas de supervivencia de los CTs.

Observamos una diferencia significativa en cuanto a la influencia del sexo: mientras que el 100% de las mujeres permanecían vivas a los 10 años, sólo lo conseguía el 37% de los hombres. Además, cuando el complejo cadherina-E/ β -catenina estaba alterado, la supervivencia a los 10 años era del 56%, frente al 94% de aquellos pacientes en cuyos tumores el complejo permanecía íntegro. Ninguna otra variable anatomopatológica ni molecular mostró impacto en la supervivencia de los CT. Estos resultados resaltan el potencial valor de la determinación inmunohistoquímica del estado del complejo cadherina-E/ β -catenina para poder identificar a los pacientes con CT con un pronóstico peor y así poder someterles a exámenes más exhaustivos o a tratamientos adicionales. Todo ello redundaría sin duda en un mejor resultado clínico.

En la serie de TNEGEP, como era de esperar, las variables clínicopatológicas como índice mitótico, Ki67, grado, diferenciación, necrosis, afectaban significativamente a los tiempos de supervivencia. Entre las alteraciones moleculares, la alteración de complejo cadherina-E/ β -catenina, así como la expresión elevada de Snail1 y el patrón citoplásmico de cadherina-E, reducían las tasas de supervivencia de los pacientes con TNEGEP.

En resumen, nuestros resultados apuntan a la importancia diferencial de la pérdida de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina en el desarrollo de los TNE según la localización anatómica, con especial papel en los tumores localizados en el pulmón, en los que encontramos indicios de la presencia de TEM asociada a malignidad, así como de mecanismos postranscripcionales que contribuirían a la desestabilización de

cadherina-E. Asimismo, este trabajo aporta herramientas moleculares de potencial utilidad clínica tanto en el manejo de TNE de pulmón como GEP, ayudando en el diagnóstico diferencial y aportando información sobre el pronóstico.

Como continuación de los estudios presentados, nos proponemos ahondar más en el conocimiento de las bases moleculares implicadas en el desarrollo de estos tumores, con atención a vías de señalización intracelulares de especial importancia, como la mediada por PI3K/Akt, que podría aportar nuevos marcadores de utilidad clínica, tanto para el refinamiento en el diagnóstico, como de pronósticos de la evolución clínica o de la respuesta al tratamientos.

7. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos y el papel descrito por los represores del gen de cadherina-E en la inducción de la Transición Epitelio-Mesénquima en los procesos de carcinogénesis, proporcionando a las células tumorales propiedades invasivas, extrajimos las siguientes conclusiones:

1. Los niveles elevados de Snail1 y Snail2 y la represión de cadherina-E con aumento de Vimentina citoplásmica, justifican la activación del programa de TEM en los TNE de pulmón con una participación en el proceso neoplásico más evidente que en los TNEGEP.

2. En los TNE de pulmón, además de la regulación transcripcional del gen de cadherina-E por los represores transcripcionales, podrían estar presentes mecanismos de regulación posttranscripcional.

3. El cambio de patrón de expresión de cadherinas (“*switch*”), relacionado comúnmente con invasión y metástasis en muchos tipos tumorales, no se produce al aumentar la malignidad de los TNE. Al contrario, el nivel de expresión de cadherina-N sigue un curso paralelo con el de cadherina-E.

4. La detección inmunohistoquímica de β -catenina podría ser útil en la labor del diagnóstico, ya que contribuye a diferenciar anatomopatológicamente subtipos tumorales como CNCG y CPCP en TNE de pulmón y CNEG3-CG y CNG3-CP de TNEGEP.

5. La detección IHQ de la pérdida de integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina podría ser útil como marcador de pronóstico adverso en los TNEs.

6. En TNE de pulmón, el sexo y la pérdida de la integridad del complejo cadherina-E/ β -catenina, ayudarían a indentificar a los pacientes con CT de pronóstico adverso, mientras que en TNEGEP, la expresión débil de β -catenina permitiría identificar los casos con TNE G1 con peor pronóstico

8. ANEXOS

TABLA 8.1.		Edad		Sexo		Sublocal.			Tamaño		Ganglios		Necrosis		IM			Diagnóstico				Hábitos tabáquicos	
		<57	>57	♀	♂	Ct	P	A	<3cm	>3 cm	(-)	(+)	(-)	(+)	<2	3-20	>20	CT	CA	CNCG	CPCP	(-)	(+)
Expresión cadherina-E	D	33	38	19	52	58	12	1	39	32	32	34	24	32	23	4	22	24	4	8	35	20	51
	E	34	29	26	37	41	15	7	41	22	52	11	44	12	41	7	13	42	6	10	5	32	31
	p	0,387		0,076		0,026			0,232		0,000		0,000		0,031			0,000				0,007	
Patrón cadherina-E	M	41	24	29	36	45	14	6	49	16	54	11	53	10	50	3	7	52	2	5	6	39	26
	C	22	35	13	44	42	13	2	24	33	25	29	12	29	11	7	25	11	7	13	26	9	48
	p	0,007		0,011		0,444			0,000		0,000		0,000		0,000			0,000				0,000	
Expresión β-catenina	D	30	36	15	51	55	8	3	31	35	26	35	20	30	18	2	23	20	2	8	36	16	50
	E	37	31	30	38	44	19	5	49	19	58	10	48	14	46	9	12	46	8	10	4	36	32
	p	0,3		0,009		0,046			0,003		0,000		0,000		0,000			0,000				0,001	
Patrón β-catenina	M	42	33	32	43	50	18	7	52	23	61	14	51	20	50	8	13	50	7	9	9	41	34
	C	12	19	6	25	24	7	0	12	19	11	18	6	17	5	2	14	5	2	7	17	3	28
	N	4	4	2	6	7	0	1	3	5	3	5	0	1	0	1	3	0	1	1	6	0	8
	p	0,269		0,06		0,224			0,006		0,000		0,000		0,000			0,000				0,000	
Integridad del complejo cadh-E/β-cat.	Ínt	33	18	24	27	33	12	6	38	13	46	5	43	8	42	3	5	42	2	4	3	33	18
	Alt	34	49	21	62	66	15	2	42	41	38	40	25	36	22	8	30	24	8	14	37	19	64
	p	0,008		0,010		0,049			0,006		0,000		0,000		0,000			0,000				0,000	
Expresión cadherina-N	D	30	37	12	55	51	13	3	32	35	40	24	30	22	26	6	22	28	5	9	25	21	46
	E	37	30	33	34	48	14	5	48	19	44	21	38	22	38	5	13	38	5	9	15	31	36
	p	0,227		0,000		0,731			0,005		0,536		0,542		0,26			0,26				0,076	
Patrón cadherina-N	M	31	14	25	20	28	15	2	35	10	35	10	29	11	28	8	8	28	8	7	2	21	24
	C	25	31	18	38	46	7	3	30	26	30	22	25	20	25	0	15	25	0	6	25	21	35
	p	0,015		0,018		0,041			0,012		0,036		0,105		0,006			0,000				0,353	
Expresión Snail1	D	44	29	36	37	52	17	4	51	22	61	12	55	14	52	9	10	54	9	9	1	44	29
	E	23	38	9	52	47	10	4	29	32	23	33	13	30	12	2	25	12	1	9	39	8	53
	p	0,009		0,000		0,606			0,009		0,000		0,000		0,000			0,000				0,000	
Expresión Snail2	D	46	31	35	42	51	21	5	51	26	66	11	57	17	53	7	14	55	7	13	2	43	34
	E	21	36	10	47	48	6	3	29	28	18	34	11	27	11	4	21	11	3	5	38	9	48
	p	0,009		0,001		0,048			0,073		0,000		0,000		0,000			0,000				0,000	
Expresión Twist	D	37	34	26	45	45	21	5	44	27	57	14	45	20	41	8	17	43	7	12	9	37	34
	E	30	33	19	44	54	6	3	36	27	27	31	23	24	23	3	18	23	3	6	31	15	48
	p	0,604		0,429		0,010			0,569		0,000		0,03		0,214			0,000				0,001	
Expresión Foxc2	D	48	44	37	35	68	20	4	57	35	64	25	58	22	56	6	20	57	6	11	18	43	49
	E	19	23	8	34	31	7	4	23	19	20	20	10	22	8	5	15	9	4	7	22	9	33
	p	0,456		0,016		0,436			0,431		0,016		0,000		0,001			0,000				0,005	
Expresión Vimentina	(-)	65	61	43	83	91	27	8	67	49	81	40	67	1	63	10	34	65	9	18	34	50	76
	(+)	2	5	1	6	7	0	0	2	5	40	5	41	2	1	0	1	1	0	0	6	1	6
	p	0,236		0,278		0,267			0,088		0,039		0,314		0,812			0,012				0,179	

TABLA 8.2.		Expresión de cadherina-E		Patrón de cadherina-E		Expresión de β-catenina		Patrón de β-catenina			Integridad del complejo cadherina-E/ β-catenina		Expresión de cadherina-N		Patrón de cadherina-N		Expresión de Vimentina		Expresión de Snail1		Expresión de Snail2		Expresión de Twist	
		D	E	M	C	D	E	M	C	N	Ínt	Alt	D	E	M	C	(-)	(+)	D	E	D1	E	D	E
Patrón de cadherina-E	M	26	39																					
	C	34	23																					
	P	0,030																						
Expresión de β-catenina	D	52	14	21	35																			
	E	19	49	44	22																			
	P	0,000		0,001																				
Patrón de β-catenina	M	29	46	51	21	17	58																	
	C	21	10	4	25	24	7																	
	N	5	3	0	6	7	1																	
	p	0,017		0,000		0,000																		
Integridad del complejo cadh-E/ β-cat	Ínt	17	34	51	0	9	42	51	0	0														
	Alt	54	29	14	57	57	26	24	31	8														
	p	0,000		0,000		0,000		0,000																
Expresión de cadherina-N	D	35	32	28	33	38	29	31	18	6	19	48												
	E	36	31	37	24	28	39	44	13	2	32	35												
	p	0,863		0,102		0,08		0,08		0,020														
Patrón de cadherina-N	M	22	23	24	19	11	34	30	11	1	20	25	13	32										
	C	33	23	27	22	35	21	20	15	4	22	34	21	35										
	p	0,314		0,945		0,000		0,36		0,601		0,363												
Expresión de Vimentina	(-)	65	61	63	54	60	66	71	29	6	50	76	62	64	44	52								
	(+)	5	2	2	3	6	1	3	2	2	1	6	5	2	0	4								
	p	0,306		0,543		0,050		0,065		0,179		0,252		0,07										
Expresión de Snail1	D	32	41	51	19	26	47	52	10	1	42	31	32	31	37	22	71	1						
	E	39	22	14	38	40	21	23	21	7	9	52	35	26	8	34	55	6						
	P	0,020		0,000		0,001		0,000		0,000		0,118		0,000		0,030								
Expresión de Snail2	D	31	46	50	24	27	50	54	14	0	41	36	33	44	34	28	75	1	61	16				
	E	40	17	15	33	39	18	21	17	0	10	47	34	23	11	28	51	6	12	45				
	P	0,001		0,000		0,000		0,000		0,000		0,055		0,009		0,019		0,000						
Expresión de Twist	D	39	37	42	24	31	40	45	13	1	32	39	40	31	28	19	67	3	49	22	53	18		
	E	37	26	23	33	35	28	30	18	7	19	44	27	36	17	37	59	4	24	39	24	39		
	P	0,209		0,013		0,169		0,017		0,076		0,119		0,005		0,595		0,000		0,000				
Expresión de Foxc2	D	46	46	53	32	40	52	55	20	1	41	51	46	46	35	33	87	4	62	30	62	30	59	33
	E	25	17	12	25	26	16	20	11	7	10	32	21	21	10	23	39	3	11	31	15	27	12	30
	p	0,306		0,002		0,048		0,002		0,022		1		0,045		0,51		0,000		0,001		0,000		

TABLA 8.3.		Edad		Sexo		Localización				Tamaño		Ganglios		Invasión vascular		Necrosis		Grado tumoral			Estadio		Diagnóstico				Hábitos tabáquicos		Hábitos alcohólicos	
		<57	>57	♀	♂	Esto	Int. Del	Col-Rec	Pánc	<2,7cm	>2,7 cm	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	G1	G2	G3	I-II	III-IV	TNE G1	TNE G2	CNEG3 (CG)	CNEG3 (CP)	(-)	(+)	(-)	(+)
Expresión de cadherina-E	D	22	26	28	20	8	15	12	13	23	24	33	15	25	23	37	11	26	10	12	22	24	26	10	3	9	12	16	14	14
	E	17	26	21	22	10	13	11	9	26	12	26	17	23	20	34	9	23	7	13	15	22	23	7	2	11	14	13	13	14
	p	0,544		0,364		0,834				0,071		0,409		0,893		0,819		0,787			0,507		0,84				0,504		0,891	
Patrón de cadherina-E	M	33	37	33	37	13	23	15	19	39	26	48	22	36	34	57	13	43	14	13	30	34	43	14	4	9	22	19	24	17
	C	4	13	14	3	4	4	7	2	8	9	8	9	9	8	10	7	4	2	11	6	11	4	2	1	10	4	9	2	11
	p	0,077		0,009		0,261				0,337		0,097		0,911		0,047		0,001			0,393		0,001				0,15		0,007	
Expresión de β -catenina	D	16	29	24	21	8	14	11	12	21	24	28	17	22	23	34	11	26	6	13	20	24	26	6	0	13	17	22	20	19
	E	23	33	25	21	10	14	12	10	28	12	31	15	26	20	37	9	23	11	12	17	22	23	11	5	7	9	7	7	9
	p	0,164		0,923		0,933				0,03		0,606		0,466		0,574		0,431			0,865		0,038				0,393		0,612	
Patrón de β -catenina	M	27	33	30	30	14	18	18	10	32	23	40	20	32	28	45	15	31	11	18	26	28	31	11	5	13	19	15	20	14
	C	2	5	3	4	1	1	1	4	2	5	4	3	6	1	6	1	5	0	2	4	3	5	0	0	2	2	2	2	2
	N	4	3	6	1	2	1	2	2	5	2	5	2	2	5	4	3	2	2	3	2	5	2	2	0	3	2	3	0	5
	p	0,555		0,173		0,336				0,232		0,84		0,097		0,455		0,503			0,529		0,497				0,793		0,049	
Integridad del complejo cadh-E/β-cat.	Ínt	25	27	24	28	12	17	13	10	29	18	37	15	27	25	41	11	30	10	12	24	22	30	10	4	8	16	11	18	9
	Alt	13	24	24	13	6	10	9	12	19	18	20	17	20	17	28	9	18	6	13	13	24	18	6	1	12	10	18	9	19
	p	0,224		0,081		0,52				0,341		0,098		0,843		0,724		0,459			0,121		0,242				0,08		0,01	
Expresión de cadherina-N	D	11	19	20	10	8	6	10	6	17	13	18	12	14	16	18	12	12	3	15	13	17	12	3	0	15	13	17	12	18
	E	28	33	29	32	10	22	13	16	32	23	41	20	34	27	53	8	37	14	10	24	29	37	14	5	5	13	12	15	10
	p	0,403		0,085		0,237				0,893		0,498		0,415		0,004		0,003			0,864		0,0001				0,522		0,14	
Patrón de cadherina-N	M	3	5	3	5	2	0	2	4	4	4	7	1	3	5	8	0	5	2	1	6	2	5	2	0	1	5	3	5	3
	C	5	13	11	7	2	9	2	5	8	10	8	10	8	10	15	3	14	2	2	6	12	14	2	0	2	9	9	11	7
	p	0,62		0,265		0,103				0,793		0,04		0,741		0,22		0,644			0,049		0,644				0,555		0,946	
Expresión de Snail1	D	22	23	21	24	8	22	9	6	27	13	30	15	21	24	39	6	28	10	7	17	22	28	10	1	6	9	13	11	11
	E	16	29	27	18	10	5	14	16	21	23	28	17	26	19	31	14	20	7	18	20	23	20	7	4	14	17	16	16	17
	p	0,2		0,205		0,001				0,067		0,66		0,291		0,043		0,035			0,791		0,076				0,44		0,912	
Expresión de Snail2	D	22	29	25	26	8	22	11	10	25	22	31	20	22	29	40	11	27	12	12	20	28	27	12	3	9	14	18	15	17
	E	17	23	24	16	10	6	12	12	24	14	28	12	26	14	31	9	22	5	13	17	18	22	5	2	11	12	11	12	11
	p	0,951		0,297		0,039				0,355		0,361		0,038		0,915		0,344			0,532		0,475				0,531		0,698	
Expresión de Twist	D	24	24	26	22	7	19	14	8	26	18	33	15	25	23	38	10	27	10	11	18	26	27	10	1	10	13	17	13	17
	E	15	28	23	20	11	9	9	14	23	18	26	17	23	20	33	10	22	7	14	19	20	22	7	4	10	13	12	14	11
	p	0,146		0,948		0,074				0,78		0,409		0,893		0,781		0,569			0,475		0,462				0,522		0,349	
Expresión de Foxc2	D	20	19	18	21	4	24	7	4	24	10	26	13	18	21	36	3	25	10	4	15	19	25	10	1	3	7	9	9	7
	E	19	33	31	21	14	4	16	18	25	26	33	19	30	22	35	17	24	7	21	22	27	24	7	4	17	19	20	18	21
	p	0,16		0,202		0,0001				0,049		0,751		0,275		0,004		0,005			0,944		0,015				0,737		0,496	
Expresión de Vimentina	(-)	32	49	43	38	18	26	18	19	45	31	52	29	43	38	62	19	42	16	23	31	42	42	16	4	19	22	27	22	27
	(+)	7	3	6	4	0	2	5	3	4	5	7	3	5	5	9	1	7	1	2	6	4	7	1	1	1	4	2	5	1
	p	0,06		0,679		0,137				0,397		0,717		0,854		0,332		0,542			0,295		0,543				0,313		0,075	

TABLA 8.4.	Expresión de cadherina-E		Patrón de cadherina-E		Expresión de β-catenina		Patrón de β-catenina			Integridad del complejo cadh-E/ β-cat		Expresión de cadherina-N		Patrón de cadherina-N		Expresión de Vimentina		Expresión de Snail1		Expresión de Snail2		Expresión de Twist		
	D	E	M	C	D	E	M	C	N	Ínt	Alt	D	E	M	C	(-)	(+)	D	E	D	E	D	E	
Patrón de cadherina-E	M	36	34																					
	C	10	7																					
	P	0,584																						
Expresión de β-catenina	D	29	16	32	11																			
	E	19	27	38	6																			
	P	0,027		0,16																				
Patrón de β-catenina	M	28	32	52	8	27	33																	
	C	5	2	4	3	4	3																	
	N	4	3	3	4	1	6																	
	p	0,428		0,007		0,221																		
Integridad del complejo cadh-E/ β-cat	Ínt	23	29	52	0	21	31	52	0	0														
	Alt	25	12	18	17	24	13	8	7	7														
	p	0,029		0,0001		0,023		0,0001																
Expresión de cadherina-N	D	13	17	20	9	20	10	18	3	5	13	17												
	E	35	26	50	8	25	36	42	4	2	39	20												
	p	0,207		0,056		0,021		0,085			0,039													
Patrón de cadherina-N	M	4	4	7	1	4	4	7	0	0	7	1	0	8										
	C	12	6	15	3	16	2	10	1	0	8	10	1	17										
	p	0,42		0,786		0,03		0,412			0,04		0,497											
Expresión de Vimentina	(-)	41	40	62	16	40	41	53	7	7	46	33	28	53	6	16								
	(+)	7	3	8	1	5	5	7	0	0	6	4	2	8	2	2								
	p	0,247		0,501		0,971		0,406			0,915		0,355		0,365									
Expresión de Snail1	D	24	21	40	2	22	23	31	1	2	30	13	12	33	4	7	42	3						
	E	23	22	29	15	23	22	28	6	5	21	24	18	27	4	11	38	7						
	P	0,833		0,001		0,833		0,096			0,028		0,18		0,597		0,18							
Expresión de Snail2	D	29	22	40	10	29	22	34	4	2	28	22	17	34	2	14	48	3	32	19				
	E	19	21	30	7	16	24	26	3	5	24	15	13	27	6	4	33	7	13	26				
	P	0,375		0,9		0,1		0,364			0,599		0,933		0,011		0,079		0,006					
Expresión de Twist	D	26	22	39	8	26	22	31	2	5	27	21	21	27	0	10	43	5	29	18	32	16		
	E	22	21	31	9	19	24	29	5	2	25	16	9	34	8	8	38	5	16	27	19	24		
	P	0,774		0,521		0,342		0,274			0,652		0,021		0,007		0,854		0,02		0,031			
Expresión de Foxc2	D	24	15	31	6	19	20	24	2	2	23	15	6	33	1	10	34	5	31	7	29	10	29	10
	E	24	28	39	11	26	26	36	5	5	29	22	24	28	7	8	47	5	14	38	22	30	19	33
	p	0,146		0,501		0,904		0,73			0,729		0,002		0,04		0,629		0,0001		0,002		0,0001	

Tabla 8.1.: Correlaciones estadísticas entre las variables clínico-patológicas y valoraciones moleculares de IHQ en TNE de Pulmón.

Tabla 8.2.: Correlaciones estadísticas entre las distintas valoraciones moleculares por IHQ en TNE de Pulmón

Tabla 8.3.: Correlaciones entre variables clínico- patológicas y valoraciones moleculares por IHQ en TNEGEP

Tabla 8.4.: Correlaciones estadísticas entre las distintas valoraciones moleculares por IHQ en TNEGEP

Abreviaturas: D: débil; E:elevada; M: membrana; C:citoplasma; N:nuclear; Int: íntegro; Alt: alterado; (-): ausente; (+): presente; Est: estómago; Int Del: intestino delgado; ColRec: colon-recto; Panc: páncreas; Ct: central; P: periférico; A: ambas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Adriaensen D, Scheuermann DW. Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *Anat Rec.* 1993 May;236(1):70-85.
2. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *The American journal of anatomy.* 1974 Dec;141(4):537-61.
3. Rehfeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiological reviews.* 1998 Oct;78(4):1087-108.
4. O'Dorisio TM. Gut endocrinology: clinical and therapeutic impact. *The American journal of medicine.* 1986 Dec 22;81(6B):1-7.
5. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004 Apr;1014:1-12.
6. Rindi G, Ubiali A, Villanacci V. The phenotype of gut endocrine tumours. *Dig Liver Dis.* 2004 Feb;36 Suppl 1:S26-30.
7. Gould VE, Linnoila RI. Pulmonary neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells, and pulmonary tumors. *Hum Pathol.* 1982 Dec;13(12):1064-6.
8. Colvy TV, Koss M. N., Travis W.D. . Carcinoids and Other Neuroendocrine Tumors. In: Rosai J. SLH, ed. *Tumors of the Lower Respiratory Tract.* Washington D.C.: AFIP 1994:287-319.
9. Lauweryns JM, Goddeeris P. Neuroepithelial bodies in the human child and adult lung. *Am Rev Respir Dis.* 1975 Apr;111(4):469-76.
10. Lauweryns JM, Cokelaere M. Hypoxia-sensitive neuro-epithelial bodies. Intrapulmonary secretory neuroreceptors, modulated by the CNS. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1973 Dec 21;145(4):521-40.
11. Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *The American journal of pathology.* 2000 Jan;156(1):269-78.
12. Fontaine J, Le Lievre C, Le Douarin NM. What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo? *General and comparative endocrinology.* 1977 Nov;33(3):394-404.
13. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Developmental biology.* 2004 Jun 15;270(2):443-54.
14. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2639-44.
15. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics.* 1999 Nov;23(3):323-8.
16. Solcia EK, G. Sobin, L.H. Histological typing of endocrine tumours. 2nd Ed WHO International Histological Classification of Tumours Springer New York. 2000.

17. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumours of the Digestive System: Stylus Pub Llc 2010.
18. Kultschitzky N. Zur Frage über den Bau des Darmkanals. Arch Mikrosk Anat. 1897;47:1.
19. Oberndorfer S. Karzinoide Tumores des Dunndarms. Frankfurztz pathol 1907;1:6.
20. Gosset A MP. Tumeurs endocrines de l'appendice. Presse Med 1914;22.
21. Feyrter F. Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen. Verlang. Wien-Dusseldorf. 1953.
22. Soga J, Tazawa K. Pathologic analysis of carcinoids. Histologic reevaluation of 62 cases. Cancer. 1971 Oct;28(4):990-8.
23. Astudillo A., Galván J.A. Epidemiología y clasificación de los Tumores Neuroendocrinos del Tracto Gastrointestinal. Revisiones en Cáncer. 2008;22(3):9.
24. Lloyd RV. Practical markers used in the diagnosis of neuroendocrine tumors. Endocrine pathology. 2003 Winter;14(4):293-301.
25. Lloyd RV, Mervak T, Schmidt K, Warner TF, Wilson BS. Immunohistochemical detection of chromogranin and neuron-specific enolase in pancreatic endocrine neoplasms. The American journal of surgical pathology. 1984 Aug;8(8):607-14.
26. Páramo CÁ, E. Cromogranina A. La familia cromogranina-secretogranina. Endocrinol Nutr. 2008;55 (supl. 6).
27. Aller JD, R. Estrella, A. Estrada, J. Cromograninas A en el diagnóstico y seguimiento de los tumores endocrinos gastroenteropancreáticos. Endocrinol Nutr. 2008;55 (supl. 6):9-23.
28. Perren A, Komminoth P, Heitz PU. Molecular genetics of gastroenteropancreatic endocrine tumors. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004 Apr;1014:199-208.
29. Jirasek T, Mandys V, Viklicky V. Expression of class III beta-tubulin in neuroendocrine tumours of gastrointestinal tract. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society. 2002;40(3):305-10.
30. Williams ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumours. Lancet. 1963 Feb 2;1(7275):238-9.
31. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. Virchows Arch. 1995;425(6):547-60.
32. Volante M, Rindi G, Papotti M. The grey zone between pure (neuro)endocrine and non-(neuro)endocrine tumours: a comment on concepts and classification of mixed exocrine-endocrine neoplasms. Virchows Arch. 2006 Nov;449(5):499-506.
33. La Rosa S, Sessa F, Capella C, Riva C, Leone BE, Klersy C, Rindi G, Solcia E. Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours. Virchows Arch. 1996 Dec;429(6):323-33.
34. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. Pancreas. 2010 Aug;39(6):707-12.
35. Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gonen M, Jensen RT, Kidd M, Kulke MH, Lloyd RV, Moran C, Moss SF, Oberg K, O'Toole D, Rindi G, Robert ME, Suster S, Tang LH, Tzen CY, Washington MK, Wiedenmann B, Yao J. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: application of the Delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set. The American journal of surgical pathology. 2010 Mar;34(3):300-13.

36. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 2006 Oct;449(4):395-401.
37. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 2007 Oct;451(4):757-62.
38. Travis W. D. BE, Muller-Hermelink H. K., Harris C. C. (Eds.) WHO. Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Lyon. 2004.
39. Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology.* 2004;80 Suppl 1:3-7.
40. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 20;26(18):3063-72.
41. Newton JN, Swerdlow AJ, dos Santos Silva IM, Vessey MP, Grahame-Smith DG, Primates P, Reynolds DJ. The epidemiology of carcinoid tumours in England and Scotland. *British journal of cancer.* 1994 Nov;70(5):939-42.
42. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer.* 2003 Feb 15;97(4):934-59.
43. Kloppel G, Clemens A. The biological relevance of gastric neuroendocrine tumors. *The Yale journal of biology and medicine.* 1996 Jan-Feb;69(1):69-74.
44. Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch.* 2007 Aug;451 Suppl 1:S9-27.
45. Oberg K, Akerstrom G, Rindi G, Jelic S. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 5:v223-7.
46. Oberg K, Jelic S. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009 May;20 Suppl 4:150-3.
47. Capella CS, E. Sobin, L.H. Arnold, R. Endocrine tumours of the small intestine. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press. 2000:77-82.
48. McGory ML, Maggard MA, Kang H, O'Connell JB, Ko CY. Malignancies of the appendix: beyond case series reports. *Diseases of the colon and rectum.* 2005 Dec;48(12):2264-71.
49. Brenner B, Tang LH, Klimstra DS, Kelsen DP. Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review. *J Clin Oncol.* 2004 Jul 1;22(13):2730-9.
50. Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, Maggard MA, McGory ML, Ko CY. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *International journal of colorectal disease.* 2007 Feb;22(2):183-9.
51. Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Diaz-Perez JA, Martinez Del Prado MP, Alonso Orduna V, Sevilla-Garcia I, Villabona-Artero C, Beguiristain-Gomez A, Llanos-Munoz M, Marazuela M, Alvarez-Escuela C, Castellano D, Vilar E, Jimenez-Fonseca P, Teule A, Sastre-Valera J, Benavent-Vinuelas M, Monleon A, Salazar R. Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). *Ann Oncol.* 2010 Sep;21(9):1794-803.

52. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):5-21.
53. Rekhman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Nov;134(11):1628-38.
54. Cooper WA, Thourani VH, Gal AA, Lee RB, Mansour KA, Miller JI. The surgical spectrum of pulmonary neuroendocrine neoplasms. *Chest*. 2001 Jan;119(1):14-8.
55. Granberg D, Eriksson B, Wilander E, Grimfjard P, Fjallskog ML, Oberg K, Skogseid B. Experience in treatment of metastatic pulmonary carcinoid tumors. *Ann Oncol*. 2001 Oct;12(10):1383-91.
56. Zacharias J, Nicholson AG, Ladas GP, Goldstraw P. Large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinomas with neuroendocrine morphology of the lung: prognosis after complete resection and systematic nodal dissection. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):348-52.
57. Kelly K. New chemotherapy agents for small cell lung cancer. *Chest*. 2000 Apr;117(4 Suppl 1):156S-62S.
58. Caplin M, Wiedenmann B. The management of patients with neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer*. 2003 Dec;10(4):425-6.
59. Warner RR. Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology*. 2005 May;128(6):1668-84.
60. Connor SJ, Hanna GB, Frizelle FA. Appendiceal tumors: retrospective clinicopathologic analysis of appendiceal tumors from 7,970 appendectomies. *Diseases of the colon and rectum*. 1998 Jan;41(1):75-80.
61. Marx SJ, Simonds WF. Hereditary hormone excess: genes, molecular pathways, and syndromes. *Endocrine reviews*. 2005 Aug;26(5):615-61.
62. Pipeleers-Marichal M, Somers G, Willems G, Foulis A, Imrie C, Bishop AE, Polak JM, Hacki WH, Stamm B, Heitz PU, et al. Gastrinomas in the duodenum of patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and the Zollinger-Ellison syndrome. *The New England journal of medicine*. 1990 Mar 15;322(11):723-7.
63. Vortmeyer AO, Huang S, Lubensky I, Zhuang Z. Non-islet origin of pancreatic islet cell tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Apr;89(4):1934-8.
64. McCaughan BC, Martini N, Bains MS. Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985 Jan;89(1):8-17.
65. Sachithanandan N, Harle RA, Burgess JR. Bronchopulmonary carcinoid in multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer*. 2005 Feb 1;103(3):509-15.
66. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R, Travis WD. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *The American journal of surgical pathology*. 2002 Sep;26(9):1184-97.
67. Terris B, Meddeb M, Marchio A, Danglot G, Flejou JF, Belghiti J, Ruzsiewicz P, Bernheim A. Comparative genomic hybridization analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the digestive system. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998 May;22(1):50-6.
68. Zhao J, de Krijger RR, Meier D, Speel EJ, Saremaslani P, Muletta-Feurer S, Matter C, Roth J, Heitz PU, Komminoth P. Genomic alterations in well-differentiated gastrointestinal and bronchial neuroendocrine tumors (carcinoids): marked differences indicating diversity in molecular pathogenesis. *The American journal of pathology*. 2000 Nov;157(5):1431-8.

69. Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, Westin G, Akerstrom G. Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. *International journal of cancer*. 2001 Jun 15;92(6):812-5.
70. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2005 Dec 1;104(11):2292-309.
71. Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT. Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Nov;85(11):4146-56.
72. Ramnani DM, Wistuba, II, Behrens C, Gazdar AF, Sobin LH, Albores-Saavedra J. K-ras and p53 mutations in the pathogenesis of classical and goblet cell carcinoids of the appendix. *Cancer*. 1999 Jul 1;86(1):14-21.
73. Fujimori M, Ikeda S, Shimizu Y, Okajima M, Asahara T. Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. *Cancer research*. 2001 Sep 15;61(18):6656-9.
74. Su MC, Wang CC, Chen CC, Hu RH, Wang TH, Kao HL, Jeng YM, Yuan RH. Nuclear translocation of beta-catenin protein but absence of beta-catenin and APC mutation in gastrointestinal carcinoid tumor. *Annals of surgical oncology*. 2006 Dec;13(12):1604-9.
75. Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, Bregeaud L, Pepper MS, Ruzzniewski P, Belghiti J, Flejou J, Degott C. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology*. 1998 Feb;32(2):133-8.
76. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell*. 2005 Oct;8(4):299-309.
77. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell*. 2009 Mar 3;15(3):220-31.
78. Hopfner M, Sutter AP, Gerst B, Zeitz M, Scherubl H. A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839). *British journal of cancer*. 2003 Nov 3;89(9):1766-75.
79. Papouchado B, Erickson LA, Rohlinger AL, Hobday TJ, Erlichman C, Ames MM, Lloyd RV. Epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in gastrointestinal carcinoids and pancreatic endocrine carcinomas. *Mod Pathol*. 2005 Oct;18(10):1329-35.
80. Van Gompel JJ, Chen H. Insulin-like growth factor 1 signaling in human gastrointestinal carcinoid tumor cells. *Surgery*. 2004 Dec;136(6):1297-302.
81. von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T. Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer research*. 2000 Aug 15;60(16):4573-81.
82. Onuki N, Wistuba, II, Travis WD, Virmani AK, Yashima K, Brambilla E, Hasleton P, Gazdar AF. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Cancer*. 1999 Feb 1;85(3):600-7.
83. Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker RV. Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. *Endocrine-related cancer*. 2003 Dec;10(4):437-50.
84. Couce ME, Bautista D, Costa J, Carter D. Analysis of K-ras, N-ras, H-ras, and p53 in lung neuroendocrine neoplasms. *Diagn Mol Pathol*. 1999 Jun;8(2):71-9.

85. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C, Coll JL. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *The American journal of pathology*. 1996 Dec;149(6):1941-52.
86. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
87. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
88. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer research*. 1990 Oct 1;50(19):6130-8.
89. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 1999 Feb;24(2):73-6.
90. Byers S, Park M, Sommers C, Seslar S. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast cancer research and treatment*. 1994;31(2-3):203-15.
91. Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochemical pharmacology*. 2000 Oct 15;60(8):1091-9.
92. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
93. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.
94. Thiery JP. [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 2009 Dec;193(9):1969-78; discussion 78-9.
95. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.
96. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008 Jun;14(6):818-29.
97. Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol*. 2005 Mar 29;15(6):R213-28.
98. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004 Feb;36(2):173-7.
99. Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Archives of oral biology*. 2004 Sep;49(9):675-89.
100. Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells, tissues, organs*. 2007;185(1-3):146-56.
101. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells, tissues, organs*. 2007;185(1-3):7-19.
102. Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Current opinion in cell biology*. 2000 Dec;12(6):725-30.
103. Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *The EMBO journal*. 2006 Nov 29;25(23):5603-13.

104. Chapman HA. Epithelial-Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis. Annual review of physiology. Feb 19.
105. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. Mechanisms of development. 2003 Nov;120(11):1351-83.
106. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. Hepatology (Baltimore, Md. 2009 Dec;50(6):2007-13.
107. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. Journal of mammary gland biology and neoplasia. Jun;15(2):117-34.
108. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. The Journal of clinical investigation. 2009 Jun;119(6):1420-8.
109. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. The Journal of clinical investigation. 2009 Jun;119(6):1429-37.
110. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. The EMBO journal. 2006 Aug 9;25(15):3534-45.
111. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. Bioessays. 2001 Oct;23(10):912-23.
112. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell research. 2009 Feb;19(2):156-72.
113. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. Oncogene. 2005 Aug 29;24(37):5764-74.
114. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. Cancer science. 2007 Oct;98(10):1512-20.
115. Fuxe J, Vincent T, de Herreros AG. Transcriptional crosstalk between TGFbeta and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. Cell cycle (Georgetown, Tex. 2010 Jun 12;9(12).
116. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. The Journal of biological chemistry. 2000 Nov 24;275(47):36803-10.
117. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. The Journal of cell biology. 2007 Jul 30;178(3):437-51.
118. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nature cell biology. 2004 Oct;6(10):931-40.
119. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. The Journal of cell biology. 2005 Jan 3;168(1):29-33.
120. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. The Journal of cell biology. 2003 Nov 24;163(4):847-57.

121. Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, Thisse B, Gerlinger P, Perrin-Schmitt F. The M-twist gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus* X-twi and the *Drosophila* twist genes. *Developmental biology*. 1991 Feb;143(2):363-73.
122. Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG, Dedhar S. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2001 Jan 4;20(1):133-40.
123. Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer metastasis reviews*. 2003 Dec;22(4):375-84.
124. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 Apr 1;1691(1):1-15.
125. Grego-Bessa J, Diez J, Timmerman L, de la Pompa JL. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2004 Jun;3(6):718-21.
126. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Apr 29;105(17):6392-7.
127. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nature cell biology*. 2008 Mar;10(3):295-305.
128. Kemler R, Ozawa M, Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Current opinion in cell biology*. 1989 Oct;1(5):892-7.
129. Ozawa M, Engel J, Kemler R. Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell*. 1990 Nov 30;63(5):1033-8.
130. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, Dolz R, Jahnig F, Epplen J, Mayer S, et al. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *The EMBO journal*. 1987 Dec 1;6(12):3647-53.
131. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current opinion in cell biology*. 1993 Oct;5(5):806-11.
132. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology*. 1995 Oct;7(5):619-27.
133. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*. 1988 Apr;102(4):639-55.
134. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *The Journal of cell biology*. 1995 Jul;130(1):67-77.
135. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Sep 12;92(19):8813-7.
136. Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):667-75.
137. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et biophysica acta*. 1994 May 27;1198(1):11-26.

138. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998 Mar 12;392(6672):190-3.
139. Tepass U, Gruszynski-DeFeo E, Haag TA, Omatyar L, Torok T, Hartenstein V. Shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes & development*. 1996 Mar 15;10(6):672-85.
140. Edelman GM, Gallin WJ, Delouvee A, Cunningham BA, Thiery JP. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983 Jul;80(14):4384-8.
141. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development (Cambridge, England)*. 1993 Jul;118(3):829-44.
142. Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper J. Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Current opinion in cell biology*. 1991 Oct;3(5):832-40.
143. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology*. 1991 Apr;113(1):173-85.
144. Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G, de Leeuw WJ, ter Haar NT, van Roy F, Cornelisse CJ, Peterse JL, van de Vijver MJ. E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *British journal of cancer*. 1997;76(9):1131-3.
145. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*. 2001 Mar 22;20(12):1525-8.
146. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (New York, NY)*. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.
147. Liu Y, Hong Y, Zhao Y, Ismail TM, Wong Y, Eu KW. Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. *Cancer investigation*. 2008 Jul;26(6):575-82.
148. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7(6):415-28.
149. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*. 2000 Feb;2(2):84-9.
150. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*. 2000 Feb;2(2):76-83.
151. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science*. 2003 Feb 1;116(Pt 3):499-511.
152. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer research*. 2002 Mar 15;62(6):1613-8.
153. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular cell*. 2001 Jun;7(6):1267-78.
154. Grootclaes ML, Frisch SM. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*. 2000 Aug 3;19(33):3823-8.

155. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 20;276(29):27424-31.
156. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun 25;117(7):927-39.
157. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer research*. 2011 Jan 1;71(1):245-54.
158. Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Jun 12;104(24):10069-74.
159. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet*. 2009 Jun;25(6):248-52.
160. Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*. 1980 Jan 31;283(5746):474-6.
161. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science (New York, NY)*. 1994 May 6;264(5160):835-9.
162. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):155-66.
163. Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*. 2000 Oct 17;257(1):1-12.
164. Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic acids research*. 1993 Aug 25;21(17):3951-7.
165. Nakayama H, Scott IC, Cross JC. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Developmental biology*. 1998 Jul 1;199(1):150-63.
166. Nibu Y, Zhang H, Bajor E, Barolo S, Small S, Levine M. dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *The EMBO journal*. 1998 Dec 1;17(23):7009-20.
167. Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*. 2001 Apr;17(4):178-81.
168. Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Franci C, Garcia de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Molecular and cellular biology*. 2003 Jul;23(14):5078-89.
169. MacPherson MR, Molina P, Souchelnytskyi S, Wernstedt C, Martin-Perez J, Portillo F, Cano A. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Molecular biology of the cell*. 2010 Jan 15;21(2):244-53.
170. Wu Y, Evers BM, Zhou BP. Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Jan 2;284(1):640-8.
171. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *The EMBO journal*. 2005 Oct 5;24(19):3446-58.

172. Peinado H, Portillo F, Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell cycle* (Georgetown, Tex. 2005 Dec;4(12):1749-52.
173. Christofori G. Snail1 links transcriptional control with epigenetic regulation. *The EMBO journal*. 2010 Jun 2;29(11):1787-9.
174. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2004;48(5-6):365-75.
175. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2001 Jun 28;20(29):3814-23.
176. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002 May 9;21(20):3241-6.
177. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Apr 15;103(8):1631-43.
178. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK. The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig Dis Sci*. 2005 Jan;50(1):42-6.
179. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubert B, Busch R, Hofler H, Becker KF. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *The American journal of pathology*. 2002 Nov;161(5):1881-91.
180. Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Hofler H, Sarbia M. Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch*. 2006 Mar;448(3):277-87.
181. Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Jul;9(7):2657-64.
182. Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Sugimachi K, Yamamoto H, Tateishi N, Tanaka K, Matsuda S, Iwamoto Y, Ladanyi M, Tsuneyoshi M. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene*. 2004 Nov 11;23(53):8629-38.
183. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, Escriva M, Montserrat-Sentis B, Baro T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, Garcia de Herreros A. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*. 2006 Aug 24;25(37):5134-44.
184. Fendrich V, Waldmann J, Esni F, Ramaswamy A, Mullendore M, Buchholz M, Maitra A, Feldmann G. Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocrine-related cancer*. 2007 Sep;14(3):865-74.
185. Galvan JA, Gonzalez MV, Crespo G, Folgueras MV, Astudillo A. Snail nuclear expression parallels higher malignancy potential in neuroendocrine lung tumors. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands). 2010 Sep;69(3):289-95.
186. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *British journal of cancer*. 2006 Jan 16;94(1):13-7.
187. Simpson P. Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics*. 1983 Nov;105(3):615-32.
188. Thisse B, el Messal M, Perrin-Schmitt F. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic acids research*. 1987 Apr 24;15(8):3439-53.

189. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*. 2002 Apr 3;287(1-2):11-22.
190. Leptin M. Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *The EMBO journal*. 1999 Jun 15;18(12):3187-92.
191. Seher TC, Narasimha M, Vogelsang E, Leptin M. Analysis and reconstitution of the genetic cascade controlling early mesoderm morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Mechanisms of development*. 2007 Mar;124(3):167-79.
192. Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Developmental cell*. 2004 Mar;6(3):423-35.
193. Chen ZF, Behringer RR. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & development*. 1995 Mar 15;9(6):686-99.
194. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):277-9.
195. Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer research*. 2005 Dec 1;65(23):10801-9.
196. Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT, Wong YC. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):474-82.
197. Gomez I, Pena C, Herrera M, Munoz C, Larriba MJ, Garcia V, Dominguez G, Silva J, Rodriguez R, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Garcia JM. TWIST1 Is Expressed in Colorectal Carcinomas and Predicts Patient Survival. *PloS one*. 2011;6(3):e18023.
198. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes & development*. 1999 Sep 1;13(17):2207-17.
199. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of cell science*. 2005 Mar 1;118(Pt 5):873-87.
200. Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer research*. 2006 Apr 1;66(7):3365-9.
201. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *Journal of cell science*. 2008 Mar 15;121(Pt 6):727-35.
202. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews*. 2004 Feb;4(2):118-32.
203. Cavallaro U. N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy? *Curr Opin Investig Drugs*. 2004 Dec;5(12):1274-8.
204. De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E, Mareel M. Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *Journal of cell science*. 2004 Sep 15;117(Pt 20):4691-703.
205. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology*. 2000 Feb 21;148(4):779-90.

206. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of cell biology*. 1999 Nov 1;147(3):631-44.
207. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2276-88.
208. Birkenkamp KU, Coffey PJ. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J Immunol*. 2003 Aug 15;171(4):1623-9.
209. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2263-75.
210. Arden KC. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Experimental gerontology*. 2006 Aug;41(8):709-17.
211. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature reviews*. 2004 Nov;4(11):889-99.
212. Seo S, Kume T. Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Developmental biology*. 2006 Aug 15;296(2):421-36.
213. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):847-59.
214. Xu L, Massague J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Mar;5(3):209-19.
215. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7410-25.
216. Hayashi H, Kume T. Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and Hey2 expression by interacting with the VEGF-Notch signaling pathways in endothelial cells. *PloS one*. 2008;3(6):e2401.
217. Sano H, Leboeuf JP, Novitskiy SV, Seo S, Zaja-Milatovic S, Dikov MM, Kume T. The Foxc2 transcription factor regulates tumor angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. Feb 5;392(2):201-6.
218. Hayashi H, Sano H, Seo S, Kume T. The Foxc2 transcription factor regulates angiogenesis via induction of integrin beta3 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Aug 29;283(35):23791-800.
219. Seo S, Fujita H, Nakano A, Kang M, Duarte A, Kume T. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Developmental biology*. 2006 Jun 15;294(2):458-70.
220. Petrova TV, Karpanen T, Norrmen C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Yla-Herttuala S, Miura N, Alitalo K. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nature medicine*. 2004 Sep;10(9):974-81.
221. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
222. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
223. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer research*. 1989 Apr 15;49(8):2128-33.

224. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*. 2000 Aug;87(8):992-1005.
225. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec;1(6):a002899.
226. Clavel CE, Nollet F, Berx G, Tejpar S, Nawrocki-Raby B, Kaplan HH, van Roy FM, Birembaut PL. Expression of the E-cadherin-catenin complex in lung neuroendocrine tumours. *J Pathol*. 2001 May;194(1):20-6.
227. Wang GG, Yao JC, Worah S, White JA, Luna R, Wu TT, Hamilton SR, Rashid A. Comparison of genetic alterations in neuroendocrine tumors: frequent loss of chromosome 18 in ileal carcinoid tumors. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1079-87.
228. Kawahara M, Kammori M, Kanauchi H, Noguchi C, Kuramoto S, Kaminishi M, Endo H, Takubo K. Immunohistochemical prognostic indicators of gastrointestinal carcinoid tumours. *Eur J Surg Oncol*. 2002 Mar;28(2):140-6.
229. Salon C, Moro D, Lantuejoul S, Brichon Py P, Drabkin H, Brambilla C, Brambilla E. E-cadherin-beta-catenin adhesion complex in neuroendocrine tumors of the lung: a suggested role upon local invasion and metastasis. *Hum Pathol*. 2004 Sep;35(9):1148-55.
230. Pelosi G, Scarpa A, Puppa G, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, Maisonneuve P, Iannucci A, Arrigoni G, Viale G. Alteration of the E-cadherin/beta-catenin cell adhesion system is common in pulmonary neuroendocrine tumors and is an independent predictor of lymph node metastasis in atypical carcinoids. *Cancer*. 2005 Mar 15;103(6):1154-64.
231. Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, Kuroda M, Takanashi M, Horiuchi H, Imamura T, Ishikawa Y, Ishida T, Mori S, Machinami R, Kudo A. Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. *The American journal of pathology*. 1999 Nov;155(5):1549-55.
232. Asano K, Kubo O, Tajika Y, Takakura K, Suzuki S. Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. *Neurosurgical review*. 2000 Mar;23(1):39-44.
233. Zynger DL, Dimov ND, Ho LC, Laskin WB, Yeldandi AV. Differential expression of neural-cadherin in pulmonary epithelial tumours. *Histopathology*. 2008 Feb;52(3):348-54.
234. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 6;276(27):24661-6.
235. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells, tissues, organs*. 2007;185(1-3):191-203.
236. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jun 3.
237. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1174-80.
238. Hotz B, Visekruna A, Buhr HJ, Hotz HG. Beyond epithelial to mesenchymal transition: a novel role for the transcription factor Snail in inflammation and wound healing. *J Gastrointest Surg*. Feb;14(2):388-97.
239. Xu Y, Guo DF, Davidson M, Inagami T, Carpenter G. Interaction of the adaptor protein Shc and the adhesion molecule cadherin. *The Journal of biological chemistry*. 1997 May 23;272(21):13463-6.

240. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *The Journal of cell biology*. 1993 Feb;120(3):757-66.
241. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature cell biology*. 2002 Mar;4(3):222-31.
242. Serres M, Filhol O, Lickert H, Grangeasse C, Chambaz EM, Stappert J, Vincent C, Schmitt D. The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Experimental cell research*. 2000 Jun 15;257(2):255-64.
243. Pinho SS, Reis CA, Paredes J, Magalhaes AM, Ferreira AC, Figueiredo J, Xiaogang W, Carneiro F, Gartner F, Seruca R. The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin. *Human molecular genetics*. 2009 Jul 15;18(14):2599-608.
244. Zhao H, Liang Y, Xu Z, Wang L, Zhou F, Li Z, Jin J, Yang Y, Fang Z, Hu Y, Zhang L, Su J, Zha X. N-glycosylation affects the adhesive function of E-Cadherin through modifying the composition of adherens junctions (AJs) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435. *Journal of cellular biochemistry*. 2008 May 1;104(1):162-75.
245. Tamura S, Shiozaki H, Miyata M, Kadowaki T, Inoue M, Matsui S, Iwazawa T, Takayama T, Takeichi M, Monden M. Decreased E-cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg*. 1996 Nov;83(11):1608-14.
246. Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K, Debruyne FM, Bringuier PP. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer research*. 1996 Sep 15;56(18):4154-8.
247. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *International journal of cancer*. 1996 Jun 21;69(3):184-9.
248. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2002 May;36(2):115-24.
249. Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec;6(12):4789-96.
250. Pirinen RT, Hirvikoski P, Johansson RT, Hollmen S, Kosma VM. Reduced expression of alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2001 May;54(5):391-5.
251. Retera JM, Leers MP, Sulzer MA, Theunissen PH. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol*. 1998 Dec;51(12):891-4.
252. Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr;157(4 Pt 1):1319-23.
253. Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):214.

NOTA

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral, ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Astudillo A, Galván JA.** Epidemiología y clasificación de los tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal. Revisiones en cáncer, ISSN 0213-8573, Vol. 22, N°. 3, 2008 (Ejemplar dedicado a: Tumores neuroendocrinos), pags. 93-102.
- **Galván JA, González MV, Crespo G, Folgueras MV, Astudillo A.** Snail nuclear expression parallels higher malignancy potential in neuroendocrine lung tumors. Lung Cancer. 2010 Sep; 69(3):289-95.

La beca predoctoral del doctorando ha sido financiada por el Gobierno del Principado de Asturias a través de la entidad colaboradora Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT) - Programa “Severo Ochoa”.