

Alteraciones metabólicas en el cáncer de pulmón

Máster Investigación Biomédica Traslacional

Susana Molina Fernández

DIRECTOR: Dr. Marco A. Calzado Canale

Dr. Eduardo Muñoz Blanco

GLOSARIO

GLOSARIO	2
1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Cáncer de pulmón	4
2.2 Búsqueda de marcadores y nuevas terapias	5
2.3 Metabolómica	6
2.4 Métodos y técnicas en la metabolómica	6
2.5 Metabolómica en cáncer de pulmón	8
2.6 Metabolismo de las purinas	9
2.7 Metabolismo de las purinas en cáncer	13
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Pacientes y muestras.....	17
4.2 Análisis histológico.....	17
4.3 Extracción de ARN y qRT-PCR.....	18
4.4 Metabolómica	19
5. RESULTADOS	21
5.1 Caracterización de la población de estudio.....	21
5.2 Perfil metabolómico del Carcinoma Epidermoide.....	22
5.3 Metabolismo de las purinas.....	24
5.4 Análisis del perfil de expresión génica en el metabolismo de las purinas.....	28
5.5 Análisis de la expresión histológica de <i>ATIC</i> y <i>ADSL</i>	30
6. DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIONES.....	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

El cáncer de pulmón es una de las causas más comunes de muerte por cáncer. Presenta una alta incidencia y baja prognosis, con una tasa de supervivencia de 5 años. Dada la baja tasa de supervivencia actual del cáncer de pulmón, y la evidencia existente de que el diagnóstico precoz de la enfermedad reduce la mortalidad, resulta de especial interés la búsqueda de biomarcadores para esta enfermedad. En este sentido, la metabolómica se presenta como una buena herramienta para la búsqueda de indicadores que nos sirvan para identificar nuevos marcadores de la enfermedad con el fin de mejorar la supervivencia de los pacientes en todos los estadios. En este trabajo se describe la aplicación de la metabolómica con la finalidad de distinguir diferencias distintivas entre el tejido maligno y no maligno en el carcinoma epidermoide de pulmón. En este estudio fueron empleadas muestras de tejido tumoral diagnosticado como carcinoma epidermoide y su tejido normal adyacente procedente de 35 pacientes, los cuales no habían recibido quimioterapia o radioterapia previa a la operación. En base a los resultados obtenidos, se ha detectado la alteración de gran parte de los metabolitos involucrados en la ruta de las purinas. La integración de esta información junto con el análisis génico de las enzimas involucradas en esta ruta, así como el análisis proteico de algunas de ellas, nos ha permitido identificar un uso preferente de la ruta de *de novo* en la síntesis de purinas en el caso del tejido tumoral respecto al sano. Además, estos datos señalan a la enzima *ADSL* como una posible diana potencial en la terapia contra el cáncer epidermoide de pulmón. Todos estos resultados demuestran el posible uso de la monitorización de los niveles de metabolitos involucrados en el metabolismo de las purinas como nuevos marcadores de diagnóstico y/o pronóstico en el cáncer de pulmón.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer de pulmón

De entre todos los tipos de cáncer existentes, el cáncer de pulmón (CP) es la principal causa mundial de muerte por cáncer, con 1.6 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes en 2008 (Lortet-Tieulent, Soerjomataram et al. 2014). Esto representa un 13% del número total de casos de cáncer y el 18% de las muertes por esta enfermedad (Jemal, Bray et al. 2011). A pesar de que numerosas investigaciones se han llevado a cabo en este ámbito, la tasa de supervivencia no se ha visto incrementada significativamente en los últimos años. Los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón presentan una tasa de supervivencia de 5 años, cifra que puede ascender hasta un 80% si el cáncer es detectado en estadios tempranos (Wardwell and Massion 2005). No obstante, aún no existen métodos efectivos para la detección temprana del cáncer de pulmón, provocando una peor prognosis y una mayor mortalidad de la enfermedad (Tsai, Wang et al. 2014). Es por ello de vital importancia la identificación de biomarcadores específicos para esta enfermedad que permitan una detección precoz (Hassanein, Callison et al. 2012). El término CP o carcinoma broncogénico se refiere al tipo de neoplasia que se origina a partir de las células del epitelio respiratorio de la vía aérea o del parénquima pulmonar. Puede ser clasificado en 2 grupos principales: el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, Small Cell Lung Cancer) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer) (Houston, Henley et al. 2014). El cáncer de pulmón de células pequeñas, también conocido como carcinoma microcítico de pulmón, implica el 15-20% de los diagnósticos de cáncer de pulmón y es el tipo más agresivo, con actividad metastásica en el 95% de los diagnósticos (Kurup and Loehrer 2004). El cáncer de pulmón de células no pequeñas o NSCLC es el mayoritario, correspondiéndose con el 80-85% de los casos diagnosticados de esta enfermedad (Kureshi, Abidi et al. 2014). Los NSCLC pueden dividirse en 3 subtipos principales: *Adenocarcinoma*: Representa aproximadamente un 30% de todos los casos de cáncer de pulmón.

- *Carcinoma Epidermoide o de células escamosas*: Es el tipo histológico con mejor pronóstico a pesar de que en el 50% de los diagnósticos presenta metástasis.
- *Carcinoma de células grandes*: Tiene actividad metastásica en el 80% de los casos.

El cáncer de pulmón presenta dificultades en su diagnóstico, de lo que deriva la baja tasa de supervivencia del 50-70% de los pacientes diagnosticados de este tumor cuando aún no se encuentra metastatizado. El hecho de que la mayoría de pacientes con cáncer de pulmón presenten una enfermedad avanzada al momento del diagnóstico refleja en gran medida la agresividad biológica

de esta neoplasia, que habitualmente no produce síntomas hasta que causa metástasis a distancia (Feinstein and Wells 1990). Esto hace que la supervivencia disminuya aún más cuando la metástasis se ha producido, siendo un buen parámetro para determinar la supervivencia de los pacientes (Tsai, Wang et al. 2014).

El tratamiento más efectivo para el cáncer de pulmón es la cirugía en estadíos tempranos de la enfermedad. Sin embargo, tan sólo el 15-20% de los casos de cáncer son diagnosticados en esta etapa (Rossi, Maione et al. 2005; Travis, Brambilla et al. 2013). En el caso de NSCLC, el tratamiento elegido suele ser cirugía, aunque en los casos detectados en estadíos avanzados se combinan con quimioterapia paliativa. En el caso de tumores de SCLC, al presentar metástasis en un 95% de los casos, el tratamiento más empleado es la quimioterapia, combinada en algunos casos con radioterapia (Collins, Haines et al. 2007). Como la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadíos avanzados de la enfermedad, el único método de tratarlos es mediante quimioterapia paliativa, ya que no existen otros tratamientos efectivos hasta el momento (Zhou 2014). Por tanto, y con el fin de mejorar la supervivencia al cáncer de pulmón, es necesario y urgente desarrollar mejoras en el diagnóstico precoz de la enfermedad, para lo cual resulta crucial la identificación de biomarcadores.

2.2 Búsqueda de marcadores y nuevas terapias

Las conocidas limitaciones de la quimioterapia han dado lugar a la investigación y desarrollo de terapias dirigidas hacia dianas concretas características del tumor. Además, la evidencia existente de que el diagnóstico precoz de la enfermedad reduce la mortalidad ha llevado en los últimos años a un especial interés por la búsqueda e identificación de biomarcadores. Mutaciones en ADN somático (Carpagnano, Palladino et al. 2008), rutas del desarrollo y diferenciación pulmonar (Heguy, O'Connor et al. 2006), alteraciones en el número de copias y reordenación del ADN (Sekido, Fong et al. 2003), micro-ARN (Saito, Schetter et al. 2011), activación de oncogenes y rutas crecimiento celular (Adhikary and Eilers 2005; Bass, Watanabe et al. 2009; Yuan, Liu et al. 2010), genes supresores de tumores y rutas de señalización inhibitorias (Wistuba, Gazdar et al. 2001; Carretero, Medina et al. 2004; Feng, Hawes et al. 2008), células madre (Eramo, Lotti et al. 2008; Bertolini, Roz et al. 2009), etc, han sido y son actualmente fuente de búsqueda de marcadores de cáncer de pulmón. Sin embargo, estos marcadores no han resultado adecuados para la detección temprana de la enfermedad, por lo que se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos marcadores y dianas terapéuticas, especialmente que se puedan estudiar mediante métodos no invasivos. En la actualidad, numerosas investigaciones se centran en el desarrollo de marcadores

metabólicos, ya que reflejan funciones fisiológicas y características patológicas en mayor detalle que los genes y las proteínas, dado que el metaboloma es el punto en el que convergen genómica y proteómica (Hori, Nishiumi et al. 2011).

2.3 Metabolómica

Los niveles funcionales en los que se divide un sistema biológico son genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. De estos, el último es considerado como el más representativo del fenotipo del sistema (Putri, Nakayama et al. 2013). De esta manera, la metabolómica puede ser de gran utilidad para observar cambios fenotípicos relacionados con una función biológica concreta en diferentes campos científicos.

La metabolómica puede definirse como un análisis contextualizado, tanto cuantitativo como cualitativo, de metabolitos endógenos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico como, por ejemplo, biofluidos, células y tejidos (Kim, Kim et al. 2008; Spratlin, Serkova et al. 2009; O'Connell, Zhao et al. 2012). Los metabolitos son productos intermedios y finales resultantes de procesos metabólicos celulares, y sus niveles pueden reflejar la huella bioquímica del fenotipo completo de un sistema biológico. Actualmente, la metabolómica es considerada como una importante herramienta de detección y diagnóstico de enfermedades (Gowda, Zhang et al. 2008), la cual además puede ser suplementada con la información obtenida a partir de otras “ómicas”, como la genómica, proteómica o transcriptómica. Esto permite la integración de la información de los niveles superiores, ya que los cambios en los niveles de metabolitos son el resultado de alteraciones de la expresión de genes y proteínas.

Es posible catalogar los estudios de metabolómica en *dirigidos* y *no dirigidos*. Los primeros se basan en el análisis tanto cuantitativo como cualitativo de un grupo conocido de metabolitos para estudiar rutas bioquímicas concretas. Por otro lado, la metabolómica *no dirigida* es más amplia, de tal forma que se detecte el mayor número posible de metabolitos con el fin de profundizar en el conocimiento de determinados procesos biológicos (Patti, Yanes et al. 2012). Otra forma de clasificar la metabolómica la divide en 4 tipos de estrategias analíticas: Huella metabolómica, perfil metabolómico, análisis dirigido basado en isótopos y metabolómica completa (Fiehn 2001).

2.4 Métodos y técnicas en la metabolómica

Los pasos básicos para llevar a cabo un experimento metabolómico incluyen la preparación de la muestra, su análisis, adquisición de datos y procesamiento de los mismos, seguidos de la identificación y validación de los metabolitos (Nordstrom and Lewensohn 2010; Patti, Yanes et al.

2012). Por el momento, existen dos tipos de plataformas de detección para su aplicación en la metabolómica, como son la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de resonancia magnética (NMR). Cada una de ellas tiene sus ventajas e inconvenientes con respecto a los requisitos necesarios para la preparación de la muestra, la adquisición de los datos y su análisis (Ferne, Trethewey et al. 2004). En los comienzos de la metabolómica, la técnica empleada era la NMR, pero su baja sensibilidad provocaba que sólo fueran detectados los metabolitos más abundantes, por lo que en la actualidad sólo se aplica esta técnica en el estudio de dianas muy abundantes (Miyamoto, Taylor et al. 2015). Los avances en la tecnología han hecho posible el uso de la cromatografía líquida y la espectrometría de masas de alta resolución. Estas nuevas técnicas han permitido aumentar el número de metabolitos caracterizados de forma simultánea al tener una mayor sensibilidad con respecto a la NMR.

La espectrometría de masas (MS) se basa en la ionización de los metabolitos y su posterior separación mediante su ratio masa-carga iónica (Dwivedi, Puzon et al. 2010). Generalmente la MS se usa conjuntamente con la cromatografía para separar los metabolitos, incrementando el espectro de detección. Uno de estos métodos de separación es la cromatografía gaseosa, la cual al combinarla con la MS (GC-MS), incrementa la resolución de la técnica. De forma similar, la MS puede acoplarse con la cromatografía líquida (LC), usada con frecuencia por la escasa manipulación que requieren las muestras. Aunque la LC-MS es empleada normalmente para analizar fluidos, recientemente varios grupos la han aplicado en tejidos incluidos y fijados en parafina (Kelly, Breitkopf et al. 2011; Want, Masson et al. 2013).

En metabolómica, las muestras analizadas pueden ser tanto células *in vivo* o *ex vivo*, fluidos o tejidos. La gran diversidad en cuanto al origen de las muestras supone un desafío ya que es necesario seguir un protocolo específico para cada uno de los casos. Los biofluidos como la orina, sangre, plasma, suero, saliva o secreciones de la próstata se emplean de forma rutinaria en estos tipos de estudios (Spratlin, Serkova et al. 2009). En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para usar tejido tumoral directamente en el análisis metabólico, lo que implica una mayor dificultad en el tratamiento de la muestra ya que debido a la gran heterogeneidad de los tumores, es posible la contaminación con el estroma circundante, al igual que es posible que el tejido se degrade (Beckonert, Coen et al. 2010). Tanto los biofluidos como los tejidos empleados contienen una concentración variable de metabolitos, por lo que es necesario el empleo de diferentes plataformas de detección con diferentes sensibilidades para identificar todos los metabolitos presentes en la muestra.

2.5 Metabolómica en cáncer de pulmón

La aplicación de la metabolómica en la búsqueda de biomarcadores en cáncer tiene dos objetivos. En primer lugar, la obtención del perfil metabólico de muestras de cáncer, las cuales podrían ayudar a la prognosis y diagnóstico de los distintos tipos de estadios de dicha enfermedad. El segundo, encontrar y validar biomarcadores tempranos en plasma u otros fluidos corporales que puedan ser empleados en clínica (Zhang, Sun et al. 2015). Estos marcadores se podrían aplicar tanto en la detección temprana, como en la monitorización de la respuesta al tratamiento o en la predicción de la capacidad de metástasis del tumor. Identificar biomarcadores circulantes en fluidos corporales como sangre o suero, es un método no invasivo para el diagnóstico de cáncer. Además de ser muestras fáciles y baratas de obtener, a partir de ellas se podría recopilar información sobre el estado de salud de un paciente. Aunque la sangre es un fluido ideal para detectar nuevos biomarcadores (Sozzi and Boeri 2014), también es posible el uso de otros como el sudor (Calderon-Santiago, Priego-Capote et al. 2015).

La existencia de alteraciones metabólicas en cáncer se conoce desde hace mucho tiempo, especialmente en aquellas rutas relacionadas con el crecimiento, proliferación celular y síntesis de componentes (Gowda, Zhang et al. 2008; Miyamoto, Taylor et al. 2015). La característica más estudiada del metabolismo de las células cancerosas es el metabolismo del carbono y con ello la relación entre glicolisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. En este aspecto, es clave el efecto Warburg (Warburg 1956), por el cual las células neoplásicas incrementan la tasa de respiración anaeróbica aumentando la glicolisis y disminuyendo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Vander Heiden, Cantley et al. 2009). Actualmente es asumido que la formación de un tumor es el resultado de la interacción entre factores internos y externos, estimándose que aproximadamente el 80% de los tumores malignos están correlacionados con factores ambientales. Estos últimos llevarían a la alteración de genes y proteínas relacionadas con la carcinogénesis, los cuales se reflejarían como cambios en el metaboloma (Warburg 1956; Sutherland, Rasey et al. 1988; Hanahan and Weinberg 2000; Liotta and Kohn 2001; Danial, Gramm et al. 2003; Cairns 2006). El conocimiento de los cambios metabolómicos que se asocian al desequilibrio entre crecimiento, estasis celular, apoptosis y diferenciación que caracterizan a los tumores es clave para mejorar la detección precoz del cáncer.

El análisis del perfil metabolómico característico del cáncer de pulmón está aún en sus primeras etapas, existiendo un número limitado de trabajos que han empleado muestras muy variadas. En líneas generales, estos trabajos han encontrado aumentados los niveles de compuestos relacionados con el metabolismo del carbono como glucosa, lactato, citrato y succinato (Fan, Lane

et al. 2009; Hensley and DeBerardinis 2015; Musharraf, Mazhar et al. 2015), indicando el papel esencial de estos metabolitos como fuente de energía en las muestras cáncer de pulmón (Hori, Nishiumi et al. 2011; Hensley and DeBerardinis 2015). En el mismo sentido, también se han detectado niveles aumentados de colesterol y ácidos grasos como palmítico y octadecanoico (Musharraf, Mazhar et al. 2015). Se ha observado en algunos trabajos un considerable aumento de ciertos aminoácidos como alanina, glicina, prolina y aspartato en muestras de enfermos de cáncer de pulmón con respecto a controles sanos (Fan, Lane et al. 2009; Hori, Nishiumi et al. 2011). Un aminoácido a tener en cuenta es la glutamina (Gln), que pese a ser el más abundante en circulación y jugar un papel esencial en células normales, ha sido correlacionado con la aparición de cáncer y la evolución del mismo (Hori, Nishiumi et al. 2011; Mohamed, Deng et al. 2014). Otros compuestos nitrogenados que se encuentran alterados en tejido tumoral frente a tejido sano son los nucleótidos, que ven aumentada su concentración hasta un 100% (Hori, Nishiumi et al. 2011).

Una vía de análisis metabólico actualmente en auge en relación al cáncer de pulmón es el análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), ya que ofrecen alta sensibilidad y especificidad (Phillips, Altorki et al. 2007). Este tipo de compuestos son fácilmente detectados en exhalado, aunque también es posible encontrarlos en plasma, orina y muestras de tejido tumoral *in vivo* e *in vitro* (Deng, Zhang et al. 2004; Kalluri, Naiker et al. 2014; Liu, Wang et al. 2014). Los VOCs mayormente caracterizados han sido alcanos y metil-alcanos, aunque también ciertos derivados de ácidos grasos (Guo, Wang et al. 2012), isopropanol y formaldehído (Wehinger, 2009).

Finalmente, cabe destacar el empleo de la ionómica, un subcampo de la metabolómica. Haciendo uso de la ionómica se han detectado cantidades anormales de cromo en pacientes de cáncer de pulmón frente a pacientes sanos pese a no haber sido expuestos a dicho metal (Calderon-Santiago, Priego-Capote et al. 2015).

2.6 Metabolismo de las purinas

Las purinas son compuestos orgánicos cuya estructura está constituida por la unión de dos anillos, uno de seis átomos y otro de cinco, formando un heterociclo aromático (Figura 1A). En su estructura, estos anillos presentan átomos de nitrógeno, por lo que son considerados como bases nitrogenadas. Existe dos tipos de bases nitrogenadas: Las bases pirimidínicas, las cuales derivan de la estructura de la pirimidina, y que consisten en anillos de seis miembros entre las que se encuentran la citosina (C), el uracilo (U) y la timina (T), y las bases púricas, en ellas se agrupan la adenina (A), guanina (G), inosina e hipoxantina (Figura 1B y 1C). Ambos tipos de moléculas forman parte fundamental de los nucleótidos. Las bases A, T, G y C se encuentran en el ADN,

mientras que en el ARN en lugar de timina aparece el uracilo. ADN y ARN ejercen una función esencial en la célula ya que son el soporte para el almacenamiento, transferencia y expresión de la información genética (Dolle, Skoge et al. 2013). Por tanto, las purinas van a actuar como bloques en la construcción del ADN y ARN durante los procesos de crecimiento y proliferación celular (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015).

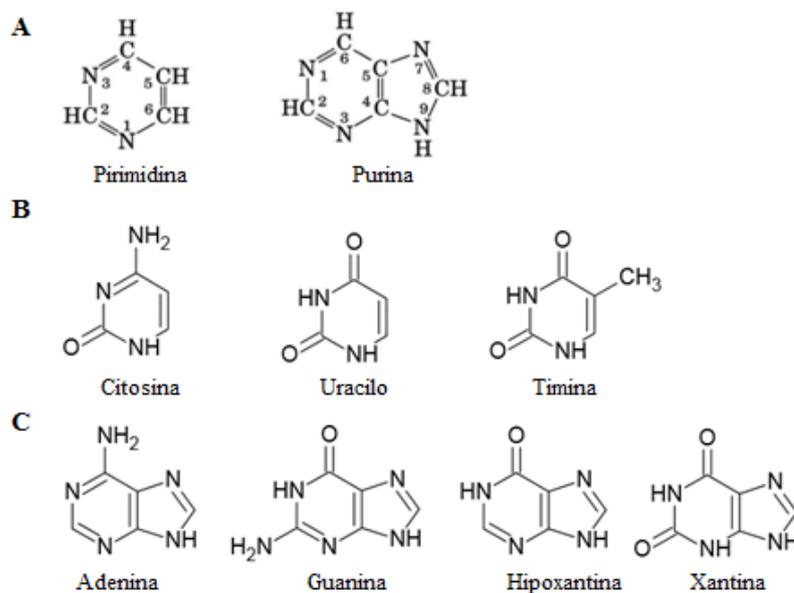


Figura 1: Bases nitrogenadas: A: Estructura básica de los dos tipos de bases nitrogenadas. B: Derivados estructurales de la base nitrogenada pirimidina. C: Derivados estructurales derivados de la base nitrogenada purina.

Además del papel relevante que tienen estas moléculas en el material genético, las purinas y sus derivados también van a formar parte de moléculas energéticas, permitiendo la liberación de energía al escindirse de los grupos fosfatos terminales de los nucleótidos trifosfato, acoplándose a un gran número de procesos donde se requiere aporte energético o donación de grupos fosfato. Además, estas moléculas presentan otras funciones como ser cofactores en reacciones enzimáticas, mediadores celulares como el AMPc o intermediarios en otras rutas biosintéticas como en la glucogénesis o el metabolismo de los fosfolípidos (Gottle, Burhenne et al. 2013).

El metabolismo de las purinas es una red altamente compleja y regulada para mantener los niveles adecuados de purinas intracelulares. Los requerimientos de estos componentes son diferentes durante el desarrollo celular, por ello dicha ruta debe estar estrictamente regulada según las necesidades celulares (Dolle, Skoge et al. 2013). Para ello, se lleva a cabo una serie de arduas interacciones entre 3 rutas principales: la síntesis *de novo*, la vía de recuperación y el ciclo de degradación y excreción de los nucleótidos de purina (PNC) (Pospisilova, Vit et al. 2013).

La síntesis de nucleótidos de purina en las células es posible gracias a 2 rutas: la ruta de síntesis *de novo* y la de recuperación.

a) Síntesis *de novo*:

Esta ruta comienza con una molécula de ribosa-5-fosfato, la cual es convertida a través de diez pasos posteriores en el precursor inositol monofosfato (IMP) (Figura 2). IMP es un anillo de purina que actúa como precursor de los nucleótidos de purina, y que puede ser obtenido bien por esta ruta o bien a partir de la ruta de recuperación a partir de hipoxantina (Zhao, French et al. 2013). Seguidamente, enzimas específicas pueden catalizar el IMP en adenosín monofosfato (AMP) o a guanosín monofosfato (GMP) (Ledesma-Amaro, Buey et al. 10).

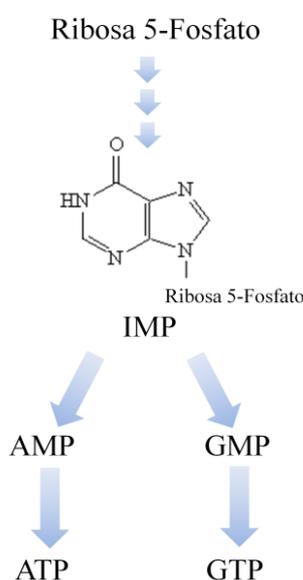


Figura 2: Esquema de la síntesis *de novo* de las purinas

Las diez reacciones secuenciales de esta ruta están catalizadas por seis enzimas altamente coordinadas para producir IMP (Tabla 1). Se ha descrito que estas enzimas establecen interacciones entre ellas, formando un complejo multienzimático funcional denominado purinosoma (An, Kumar et al. 2008). El purinosoma es constituido bajo situaciones de alta demanda de purinas, con el fin de incrementar el flujo metabólico de la síntesis *de novo* y complementar la vía de recuperación. Este complejo acelera la producción de intermediarios canalizando los metabolitos precursores, aunque por el momento no existen detalles sobre el compartimento subcelular donde se lleva a cabo este proceso. La dificultad de su estudio también reside en el hecho de que la eficiencia del purinosoma depende de la densidad del estadio estacionario de las enzimas que participan en este sistema, el cual puede oscilar de acuerdo con otros parámetros, como son las constantes catalíticas o el número

y dimensiones físicas de las enzimas (Zhao, Chiaro et al. 2015). Debido a que alteraciones en la ruta biosintética *de novo* de las purinas están relacionadas con varias enfermedades humanas, el purinosoma podría ser considerado como una diana terapéutica para su uso en tratamientos clínicos (Jackson, Hue et al. 2013).

Pasos(s)	Abreviatura	Descripción
1	<i>PPAT</i>	Fosforibosilpirofosfato amidotransferasa
2,3,5	<i>GART</i>	Trifuncional fosforibosilglicinamida formiltransferasa/ fosforibosilglicinamida sintasa/ fosforibosilaminoimidazol sintasa
4	<i>FGAMS</i>	Fosforibosilformilglicinamida sintasa
6,7	<i>PAICS</i>	Bifuncional fosforibosilaminoimidazol carboxilasa/ fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintasa
8	<i>ADSL</i>	Adenilosuccinato liasa

Tabla 1: Enzimas humanas involucradas en la conversión del fosforibosil pirofosfato mediante 10 pasos de la ruta sintética *de novo*.

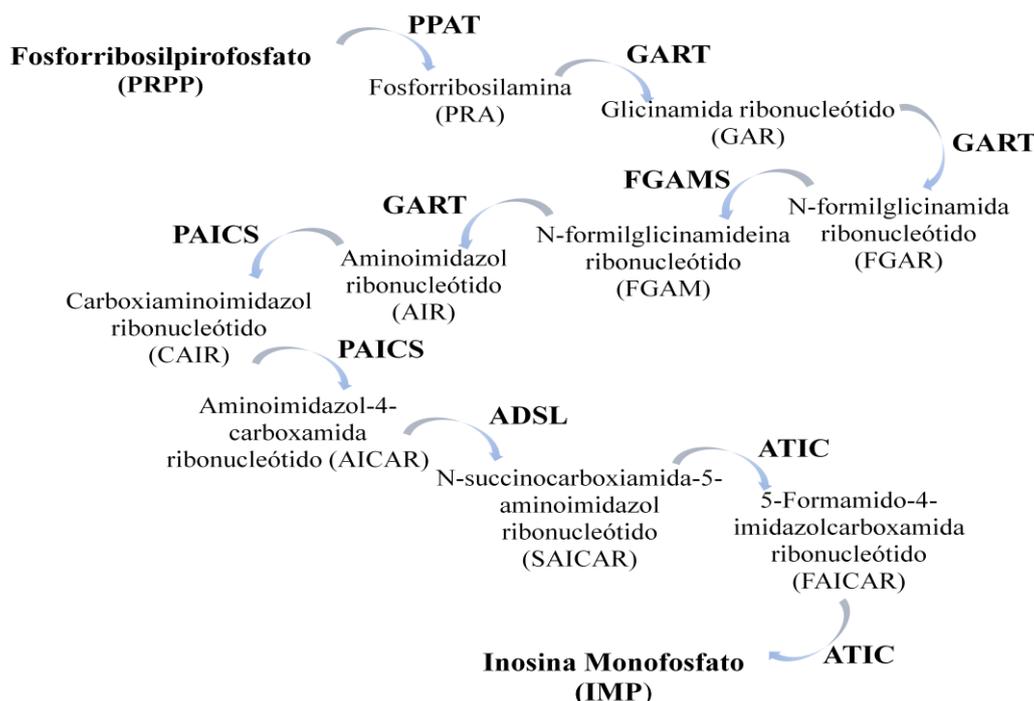


Figura 3: Ruta biosintética *de novo* de purinas en humano. Esta vía contiene 10 etapas llevadas a cabo por 6 enzimas

b) Vía de recuperación

Las bases libres de purina, como la adenina, guanina e hipoxantina, pueden ser reconvertidas a sus correspondientes nucleótidos mediante la vía de recuperación, promovida por dos enzimas

fundamentales: la Adenosín Fosforribosil-Transferasa (APRT) y la Hipoxantina-Guanina Fosforribosil-Transferasa (HGPRT). Esta ruta se activa cuando los niveles de purinas preformadas aumentan, siendo favorable para la célula, ya que este proceso es energéticamente menos costoso que la síntesis *de novo*. Sin embargo, esta recuperación también está controlada por retroalimentación, de tal forma que cuando se alcanzan los niveles suficientes de nucleótidos, se inhiben las actividades enzimáticas de la HPRT y APRT (Figura 4).

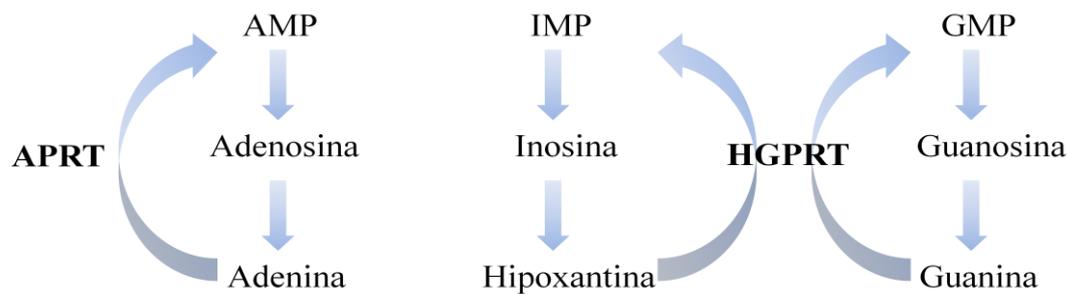


Figura 4: Ruta de recuperación de las purinas.

c) Ruta de degradación y excreción de las purinas

Ciertos niveles de purinas promueven la activación del catabolismo de las purinas, donde éstas son degradadas a hipoxantina y xantina, mediante la enzima xantina oxidasa, para dar como producto final ácido úrico.

2.7 Metabolismo de las purinas en cáncer

Como ya hemos comentados anteriormente, los nucleótidos de purinas juegan importantes y diversas funciones en el metabolismo celular, como constituyentes del ADN y ARN, señalizadores celulares o transportadores de energía (Zhao, Chiaro et al. 2015). Las células neoplásicas se caracterizan por elevada proliferación, para lo que dependen de constituyentes como los nucleótidos, y en consiguiente, la activación de la síntesis *de novo* de purinas para mantener los elevados requerimientos para la replicación de ADN y síntesis de ARN (Dang 2012). Alteraciones en la regulación de la síntesis *de novo* de las purinas están relacionadas con varias enfermedades humanas, como las inmunodeficiencias (Li, Tong et al. 2007). Durante la oncogénesis, ocurre una reprogramación metabólica que estimula el uso de intermediarios derivados de la glicólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para procesos anabólicos. Tal y como se ha descrito, existe una regulación positiva de la síntesis de purinas y pirimidinas en las células cancerígenas,

modificando el patrón de regulación de las enzimas clave involucradas en el metabolismo de las purinas, permitiendo la progresión y transformación tumoral (Liu, Li et al. 2008; Mannava, Grachtchouk et al. 2008).

Por todo ello, la biosíntesis de nucleótidos ha sido un objetivo principal de la investigación contra el cáncer desde hace varias décadas (Schwarz, Siewert et al. 2015). Una de las primeras investigaciones se llevó a cabo por Noell et al. en 1962, donde se sintetizaron una serie de derivados de tioguaninas y 2-amino-6-alkilpurina (Noell and Robins 1962). De hecho, en la actualidad algunos de los inmunosupresores más importantes, como el ácido micofenólico (MPA) y la leflunomida, son inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos (Liu, Li et al. 2008). Además, se ha descrito como diferentes oncogenes como MYC, son capaces de inducir la expresión génica de las enzimas involucradas en la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que conduce a un incremento en los niveles de nucleótidos (Liu, Li et al. 2008)

Del mismo modo, ha sido descrito la existencia de acumulación de ATP y adenosina en el microambiente tumoral (Di Virgilio 2012). Aunque previamente la liberación de ATP se consideraba como consecuencia de fugas debido al daño en las membranas de células tumorales, hallazgos recientes han descrito que se trata de un proceso estrechamente implicado en el metabolismo celular del cáncer y en la inmunidad antitumoral (Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009). La acumulación del ATP extracelular puede ser beneficiosa o perjudicial para el anfitrión dependiendo de varios factores como la concentración, la velocidad de degradación a adenosina mediante la enzima ADA y el panel de receptores expresados en las células tumorales. A ciertas concentraciones, el ATP juega un papel de inmunoestimulación y mediador proinflamatorio (Di Virgilio 2012). Ante esta evidencia, se han llevado a cabo varios modelos tumorales experimentales que muestran que la reducción de la concentración de adenosina detiene la progresión del tumor y evita metástasis, que junto con otras estrategias, permitirían preservar los niveles de ATP suficientes para que ejerza su papel inmunoestimulador beneficioso (Stagg, Divisekera et al. 2011). La adenosina afecta directamente al crecimiento tumoral, principalmente por la vía de su receptor A3, el cual se ve regulado positivamente en diferentes tumores consiguiendo un efecto antiapoptótico (Gessi, Merighi et al. 2011).

Debido a la relación existente entre las purinas y el desarrollo tumoral, se han llevado a cabo la síntesis de antimetabolitos, como los análogos de purinas, los cuales bloquean la síntesis de ADN. Uno de los primeros análogos empleados en la clínica es el 6-mercaptopurina (6-MP), además del análogo de la guanina 6-tioguanina (6-TG) (Hitchings and Elion 1954), los cuales

contribuyeron fundamentalmente a la comprensión de la ruta de síntesis de las purinas, aunque sus efectos terapéuticos no han alcanzado todo su potencial debido a su alta toxicidad (Munshi, Lubin et al. 2014). Actualmente, la combinación del 6-TG con el nucleósido natural metiltioadenosina (MTA) ha producido la desaceleración del crecimiento en dos modelos de tumores humanos de leucemia linfoblástica y carcinoma de próstata metastásico, planteándose como una droga potencialmente útil en el tratamiento de ciertos tipos de tumores (Munshi, Lubin et al. 2014). En adenocarcinomas de pulmón ha sido descrito la sobreexpresión de los genes procedentes de enzimas implicadas en la síntesis *de novo* de las purinas, incluyendo las involucradas en la formación del purinosoma (Goswami, Chen et al. 2015). La sobreexpresión de los genes *PPAT* y *PAICS* son necesarios para la tumorigénesis del pulmón, modulados a su vez por la glutamina, un aminoácido no esencial para las células normales, pero imprescindible para la transformación neoplásica (Wise and Thompson 2010). En resumen, diferentes estudios han demostrado la importancia de la ruta de las purinas en la desregulación metabólica que se produce en la carcinogénesis y durante la progresión tumoral.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar el perfil metabolómico asociado al cáncer de pulmón empleando muestras biológicas procedentes de pacientes con carcinoma epidermoide. Más concretamente, nos centraremos en el estudio de la ruta de las purinas, debido a su papel fundamental en la proliferación celular y la alta importancia que tiene su desregulación metabólica en la progresión tumoral. Para ello se analizará el perfil metabólico de tejido tumoral de pulmón, así como de tejido pulmonar sano del mismo paciente. Esto nos permitirá obtener un panel de metabolitos alterados característico de tejido tumoral de pulmón del subtipo epidermoide de cada paciente. En paralelo, realizaremos en las mismas muestras un análisis de la expresión génica de las principales enzimas participantes de la ruta biosintética de las purinas, con el fin de obtener una mayor comprensión de las alteraciones presentes en los tumores. La finalidad es poder identificar nuevos marcadores metabolómicos característicos de esta enfermedad que puedan ser usados para la detección precoz mediante el análisis de diferentes tipos de muestras biológicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Pacientes y muestras.

Las muestras de tejido pulmonar se obtuvieron de pacientes que se sometieron a cirugía para su tratamiento en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) desde enero de 2011 hasta diciembre de 2012. Se obtuvo la autorización del Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía para poder coleccionar, utilizar y almacenar las muestras en el nodo de Córdoba perteneciente al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SAS). Igualmente, se recabó el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio para la cesión de las muestras excedentes del diagnóstico y el mantenimiento del necesario anonimato. Se estableció un protocolo de envío en fresco de las piezas desde el área quirúrgica hasta el Departamento de Anatomía Patológica en un tiempo inferior a 30 minutos. Una vez recibida la pieza quirúrgica se realizó por parte de un patólogo una selección correcta de los tejidos a partir de los sobrantes para el diagnóstico, siendo la muestra conservada inmediatamente de tres formas diferentes: una parte fue congelada inmediatamente a -80 °C en solución OCT (optimum cutting temperatura), otra fue sumergida en líquido de preservación RNA-Later® (Sigma, S. Louis-MO, USA) y una tercera fue incluida en parafina para realizar estudios convencionales de histología e inmunohistoquímica. Todas las muestras incluidas en este estudio fueron revisadas y clasificadas por 2 patólogos expertos (Brambilla, Travis et al. 2001) de acuerdo a la Clasificación de Tumores de Pulmón de la Organización Mundial de la Salud, y diagnosticadas como carcinoma epidermoide (n=35). Además, tejido normal adyacente se extrajo de todos los pacientes. Ninguno de los pacientes había recibido quimioterapia o radioterapia previa a la operación. La información relativa a las características de los pacientes fue extraída de sus historias clínicas. Se realizó un análisis de ¹⁸F-FDG (flúor-18 combinado con desoxiglucosa)/CT para la captación del tumor primario y los correspondientes ganglios linfáticos mediastínicos fueron utilizados.

4.2 Análisis histológico

Se realizó una tinción inmunohistoquímica en muestras de tejido de tumor de pulmón fijadas en formalina e incluidas en parafina. La tinción de las células cancerosas fue puntuada y comparada con el tejido periférico de tejido de pulmón normal en una escala de 0 a 4: 0, <10% teñidas; 1, 10-25% teñidas; 2, 26-50% teñidas; 3, 51-75% teñidas; o 4, >75% teñidas. Se obtuvieron secciones de cinco milímetros de grosor de las muestras de tumor y se prepararon para su análisis. Se eliminó la parafina de las muestras utilizando xilol, rehidratándolas en diluciones seriadas de etanol y agua destilada. Se realizó una tinción de hematoxilina, con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ATIC

(HPA021012; Sigma-Aldrich) en una dilución 1:200 ó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ADSL (HPA000525; Sigma-Aldrich) en una dilución 1:100 durante la noche. La selección de los antígenos para ser teñidos con los anticuerpos policlonales previamente mencionados se realizó incubando las secciones en tampón citrato a un pH de 6.0 en autoclave a 120 °C durante 20 minutos para *ADSL* y en microondas a máxima potencia durante 6 minutos para *ATIC*.

4.3 Extracción de ARN y qRT-PCR

ARN total fue extraído de las muestras tanto de tejido tumoral pulmonar, como su correspondiente tejido sano adyacente, del almacenado en RNAlater[®]. Para ello se seleccionaron fragmentos de tejido de unos 50 mg de peso, y se realizó una homogeneización de las muestras mediante esferas de acero de 5 mm de diámetro en un disgregador TissueLyser LT (Qiagen). Posteriormente se realizó la extracción del ARN total en el equipo QIAcube (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante mediante el uso del RNasy Mini Kit (Qiagen), realizando una digestión con DNAsa durante el proceso (RNase-free DNase set de Qiagen), y eluyendo el ARN en un volumen final de 50 µL. La pureza del ARN obtenido se cuantificó inicialmente mediante medida de absorbancia en un NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA USA), para posteriormente ser analizada mediante microchips Experion[™] RNA StdSens Analysis Kit (BIO-RAD, Madrid, España). Sólo se seleccionaron para el estudio aquellas muestras cuyo indicador de calidad del ARN (RNA quality indicator, RQI) dio un valor igual o superior a 9. Igualmente, se descartaron las muestras contaminadas con ADN genómico o ARNt. La retrotranscripción de 500 ng de ARN total fue realizada con iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Madrid, Spain) en un volumen total de 20 µl usando un termociclador T100 de Biorad (T100 Thermal Cycler Biorad). El cDNA se diluyó 1:5 y 2 µl se utilizaron en cada reacción qPCR. Se evaluaron los niveles de expresión de 10 genes humanos (Inosina trifosfatasa, *ITPA*; IMP ciclohidrolasa, *ATIC*; IMP deshidrogenasa 2, *IMPDH2*; Guanina monofosfato sintasa, *GMPS*; Guanina monofosfato reductasa, *GMPR*; Adenilsuccinato sintasa, *ADSS*; Adenilsuccinato liasa, *ADSL*; Adenosina deaminasa, *ADA*; Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, *HGPRT*; Xantina deshidrogenasa, *XDH*) por qPCR usando iQ SYBERGreen TR PCR Kit (Biorad) en un sistema CFX96 Real Time de Biorad. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido de 39 ciclos de 30 segundos a 95 °C, el paso de hibridación a una temperatura de 60 °C (genes *GMPR*, *GMPS*, *IMPDH2*, *XDH*, *ADA*); 57.3 °C (genes *ADSL*, *ADSS*, *ATIC*; 63.5 °C (gen *HPRT*); y 62.2 °C (gen *ITPA*), 30 segundos a 72 °C para la extensión y un paso de desnaturalización de 30 segundos a 95 °C (Tabla 2). Se realizó una optimización de los cebadores y la concentración de las sondas. Las muestras se corrieron por

duplicado y los niveles de los transcritos fueron normalizados de acuerdo a controles y a la expresión de β -actina utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen control interno})$.

Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
<i>ADA</i>	CCATTCTGCACACACGTATACC	TGGCCAGGGCACATAATCA
<i>IMPDH2</i>	AGGGAAAGTTGCCCATGTAAA	TGGGTAGTCCCGATTCTTCTTC
<i>GMPS</i>	ATGGCTCTGTGCAACGGAG	CCTCACTCTTCGGTCTATGACT
<i>GMPR</i>	AATGTAGCCGTGAGTTCAGGC	GCCATAATGGTGTGTTTCAGGAAA
<i>XDH</i>	ACCGCTTCCACTACTTCAGCTAT	TTAGACTGGAGCCAACATCCATG
<i>ATIC</i>	TCTGATGCCTTCTTCCCTTT	AGGTTTCGTATGAGCGAGGAT
<i>HPRT1</i>	AATTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC
<i>ITPA</i>	AGCTGGCTCTGCTCTGAGAAA	GCTGTAGGAGAGAGCAGTGAATCC
<i>ADSL</i>	TGGTGACAGAAAAGGCAGGA	GCGTATGTCGGTGCAAATCT
<i>ADSS</i>	AGGGGTAGAGAGTTTGGTGT	GTGCCAACGCAGTAAATCCA

Tabla 2: Cebadores empleados en la PCR a tiempo real.

4.4 Metabolómica

Se llevó a cabo un análisis del perfil metabolómico de muestras de tejido pulmonar tumoral (Carcinomas epidermoides) y normal procedentes de 35 pacientes. El análisis se realizó usando la plataforma de la compañía Metabolon, empleando para ello muestras preservadas en OCT a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron preparadas empleando el sistema MicroLab STAR (Hamilton) y sometidas posteriormente a 2 análisis en paralelo: Ultrahigh performance liquid chromatography-Tandem Mass Spectroscopy (UPLC-MS/MS) en condiciones ácidas y básicas, y Cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS). Los compuestos fueron identificados por comparación con colecciones conocidas previamente pertenecientes a dicha empresa.

4.5 Análisis estadístico.

Para el análisis de las diferencias en los niveles de expresión génica de las muestras de tumor y tejido normal de pulmón se realizó la prueba de t-Student. Las diferencias cuyo valor de p fue inferior a 0,05 fueron consideradas como estadísticamente significativas. El análisis estadístico de los datos obtenidos de qPCR se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 6 (GraphPad

Software). Todos los datos son presentados como medias \pm desviación estándar en todos los experimentos y los promedios de las réplicas de cada experimento.

Para el análisis estadístico realizado a los resultados de metabolómica se emplearon test de significación estadística y análisis de clasificación. Los test de significación estadística utilizados fueron los siguientes: Test de Welch para comparar 2 medias, la t de Student para muestras pareadas, el ANOVA de una vía y de 2 vías para el análisis de la varianza, la correlación de Pearson para medir la asociación lineal entre 2 variables, y el test T2 de Hotelling. Se consideró un valor de p inferior a 0,05 como estadísticamente significativo. Como la medición de la intensidad de un metabolito concreto carece en sí mismo de relevancia clínica, siendo el valor importante su medida relativa a la media de la muestra o de la población, se determinó el z-score, también denominado standard score o normal score.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de la población de estudio.

Para este estudio decidimos centrarnos inicialmente en el análisis del perfil metabolómico de cáncer de pulmón de células no pequeñas o NSCLC, al ser el más frecuente correspondiéndose con el 80-85% de los casos diagnosticados de esta enfermedad. Para ello, hemos analizado muestras correspondientes al subtipo de Carcinoma Epidermoide. Este subtipo histológico supone el 32% de los casos de cáncer de pulmón, y es el más relacionado con el consumo del tabaco, presentándose sobre todo en pacientes fumadores afectando principalmente a hombres. De los 35 pacientes incluidos en este estudio, el 100% fueron hombres (Tabla 3). La edad media de los sujetos del estudio fue de aproximadamente 68 años, siendo la desviación típica de 7,46. Un 91,4% de pacientes (32 casos) presentaban comorbilidades, destacando por orden de frecuencia las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, digestivas, diabetes mellitus, neurológicas y urológicas. Cabe destacar el antecedente de enfermedad neoplásica en el 5% de los individuos del estudio (2 pacientes).

Características	Carcinoma Epidermoide (n=35)	p-Valor
Edad (media)	68.79±7.46	0.002
Sexo		
<i>Hombre</i>	35	0.001
<i>Mujer</i>	0	
Comorbilidades	37	0.02
Neoplasias	2	0.02
Metástasis al seguimiento	0	0.005
Tamaño tumor	4.6±2.06	0.04
Valor PET tumor	13.4±5.73	0.35
pTNM		
IA	5	
IB	12	
IIA	7	0.479
IIB	6	
IIIA	5	
Grado de diferenciación		
I	1	
II	17	0.112
III	16	
N.S.	1	

Tabla 3: Características de los pacientes

Al tratarse de un estudio diseñado para la búsqueda de marcadores tempranos de enfermedad y su posible uso en el diagnóstico precoz, decidimos seleccionar preferencialmente tumores en estadios tempranos. En ningún caso se seleccionó para la intervención quirúrgica a pacientes con un estadio cIIIA por afectación ganglionar mediastínica (N2) que hubieran recibido quimioterapia de inducción, como tampoco a pacientes con estadios IIIB o IV. El 51,4% de los pacientes intervenidos presentaron un estadio clínico I (IA+IB). En relación al estadiaje TNM patológico (pTNM), el 48,5% de los pacientes se confirmó un tumor en estadio I (IA+IB). El tamaño medio de los tumores extirpados fue de 4,6 centímetros, con un rango entre 0,5 cms y 11,0 cms y una desviación típica de 2,06.

5.2 Perfil metabólico del Carcinoma Epidermoide.

El perfil metabólico global fue determinado comparando los tejidos preservados en OCT de origen tumoral con respecto al tejido sano del mismo paciente, en un total de 35 pacientes (Tabla 4).

Grupo	N	Descripción
Normal	35	Tejido sano de pulmón de pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón.
Tumor	35	Tejido de carcinoma epidermoide de pulmón de los mismos pacientes.

Tabla 4: Procedencia de las muestras.

Un total de 800 compuestos de identidad conocida fueron determinados mediante metabolómica. Se empleó el test-t de Welch para dos muestras con el fin de identificar metabolitos con diferencias significativas entre los grupos experimentales. En la Tabla 5 se resume el número de metabolitos que mostraron una significancia estadística con valor de $p \leq 0.05$ y el número de metabolitos que obtuvieron una significancia de $0.05 < p < 0.10$.

Una estimación de la tasa de falsos negativos se obtiene con el valor q , el cual se calcula teniendo en cuenta las múltiples comparaciones que normalmente ocurren en los estudios basados en metabolómica. El valor de q describe la tasa de falsos negativos; una q baja ($q < 0,10$) es una indicación de alta confianza en un resultado. Mientras que un valor de q más alto indica la confianza disminuida, aunque no necesariamente descarta la importancia de un resultado. Otras líneas de evidencia pueden ser tomadas en cuenta para determinar si un resultado merece mayor

escrutinio. Tal evidencia puede incluir una significación a) en otra dimensión del estudio, b) la inclusión en una vía común con un compuesto altamente significativo, o c) que reside en una familia bioquímica funcional similar con otros compuestos importantes.

Comparación Estadística t-Test muestras pareadas	
Metabolitos alterados significativamente.	Tumor / Normal
Metabolitos totales $p \leq 0.05$	623
Metabolitos (↑↓)	512 / 111
Metabolitos totales $0.05 < p < 0.10$	30
Metabolitos (↑↓)	25 / 5

Tabla 5: Resumen de metabolitos alterados tras análisis estadístico de los datos.

Los resultados del estudio global del perfil metabolómico nos ha permitido identificar varias diferencias biológicas, entre las que se incluyen cambios globales metabólicos en las muestras de tumores de pulmón con respecto al tejido sano. Entre ellas, hemos observado un incremento del estrés oxidativo, el cual se explica por unos niveles elevados de marcadores oxidativos y antioxidantes como la metionina sulfóxido, el ascorbato o el glutatión reducido (GSH), además de altos niveles de cistationina y cisteína. También se observan diferencias en la utilización de la glucosa y el fosfoenolpiruvato entre otros, e incremento de los productos finales de la glicólisis, como el piruvato o el lactato. Estos cambios coinciden con los descritos ya anteriormente como el “metabolismo Wasburg”, mostrando una absorción elevada de glucosa y una activación de la glucólisis en células tumorales con alta proliferación. Igualmente, hemos observado un aumento en la producción de intermediarios de la glucólisis, al identificar niveles de indicadores adicionales del aumento de la utilización de la glucosa como la maltosa o la maltopentaosa. En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos, en los tejidos tumorales también se han detectado alteraciones, con un aumento de la presencia de marcadores de lipólisis como el monoacilglicerol y β -oxidación de ácidos grasos. Además, la presencia de elevados niveles de prostanglandina E2, D2, F2 alfa y E1, sugieren un incremento del estado inflamatorio en las muestras de tumor con respecto a las normales, estando todos estos resultados en coherencia con lo descrito en la literatura.

5.3 Metabolismo de las purinas.

A continuación, llevamos a cabo un estudio detallado de aquellos metabolitos identificados que forman parte del metabolismo de las purinas. Para ello, comparamos inicialmente las intensidades de los diferentes metabolitos entre el tejido tumoral vs el tejido pulmonar sano (Figuras 5, 6 y 7). De los 34 metabolitos involucrados en el metabolismo de las purinas que lograron ser identificados, 32 mostraron cambios significantes en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos no tumorales ($p < 0.05$) (Tabla 6). Para una información más detallada de dichos metabolitos, se adjunta en la Tabla 6 su código correspondiente de la base de datos HMDB (Human Metabolome Database).

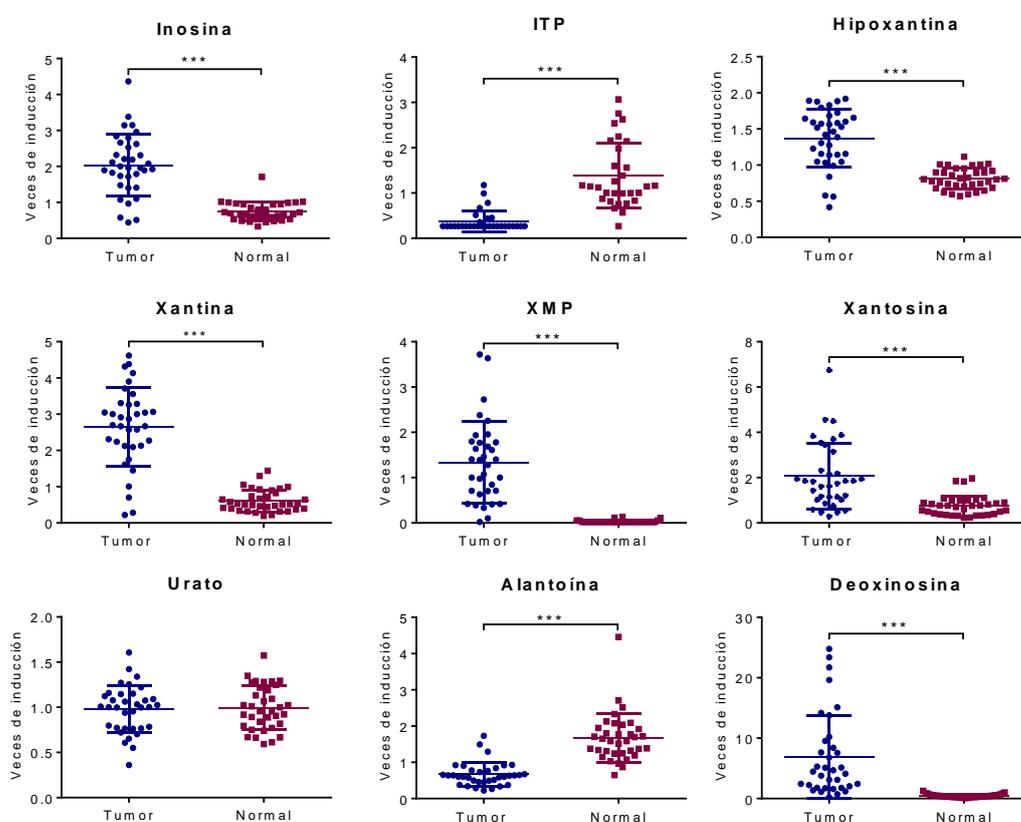


Figura 5: Análisis de los metabolitos de la ruta de las purinas que contienen Inosina/(Hipo)xantina. Para determinar diferencias estadísticas entre las muestras procedentes de tejidos de carcinoma epidermoide de pulmón (Azul) y tejido pulmonar normal (Rosa). Los datos fueron sujetos al test t-Student de muestras pareadas con dos colas. Diferencias significativas se marcan con nivel de significancia $p < 0.05$. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

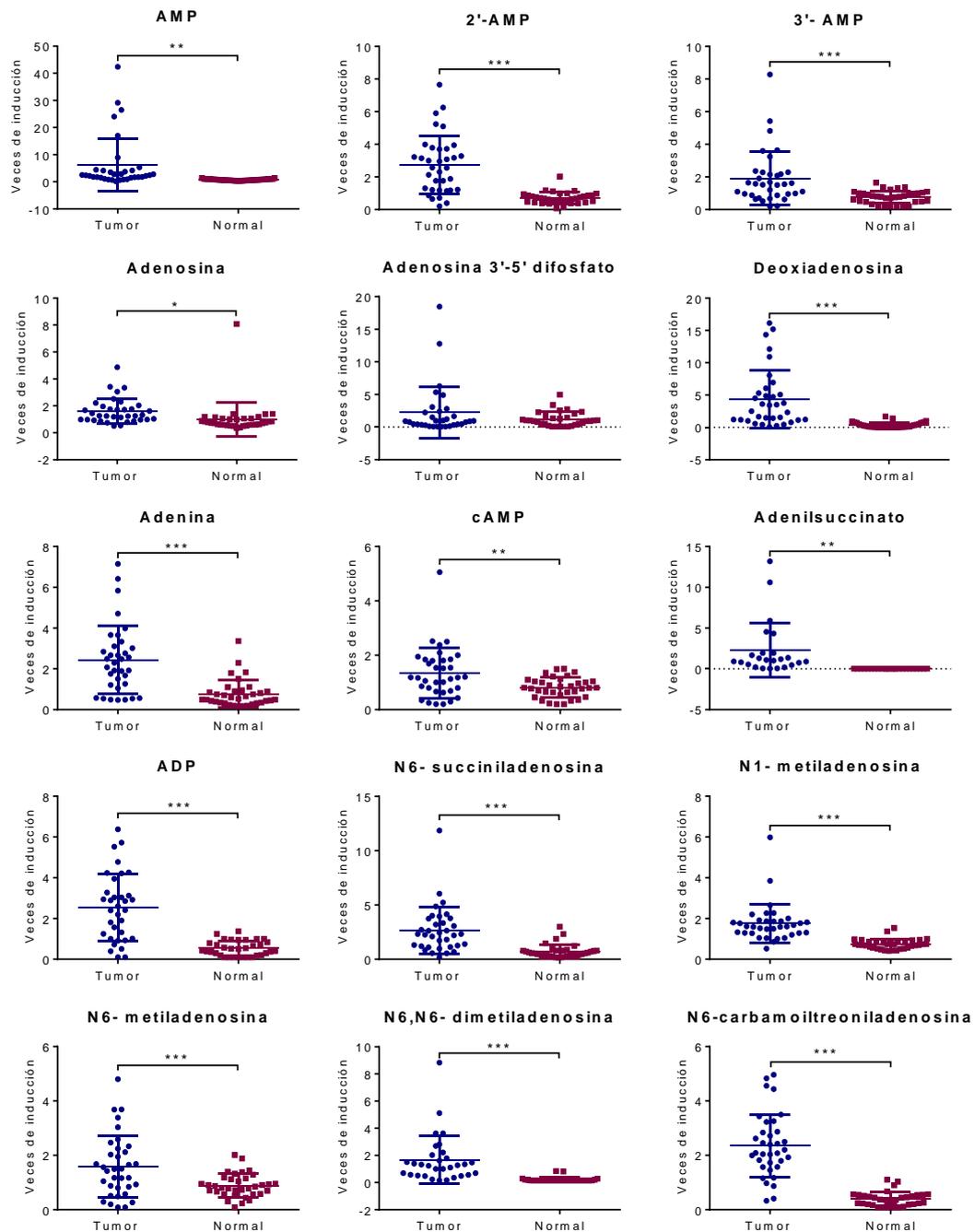


Figura 6: Análisis de los metabolitos de la ruta de las purinas que contienen Adenosina. Para determinar diferencias estadísticas entre las muestras procedentes de tejidos de carcinoma epidermoide de pulmón (Azul) y tejido pulmonar normal (Rosa). Los datos fueron sujetos al test t-Student de muestras pareadas con dos colas. Diferencias significativas se marcan con nivel de significancia $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

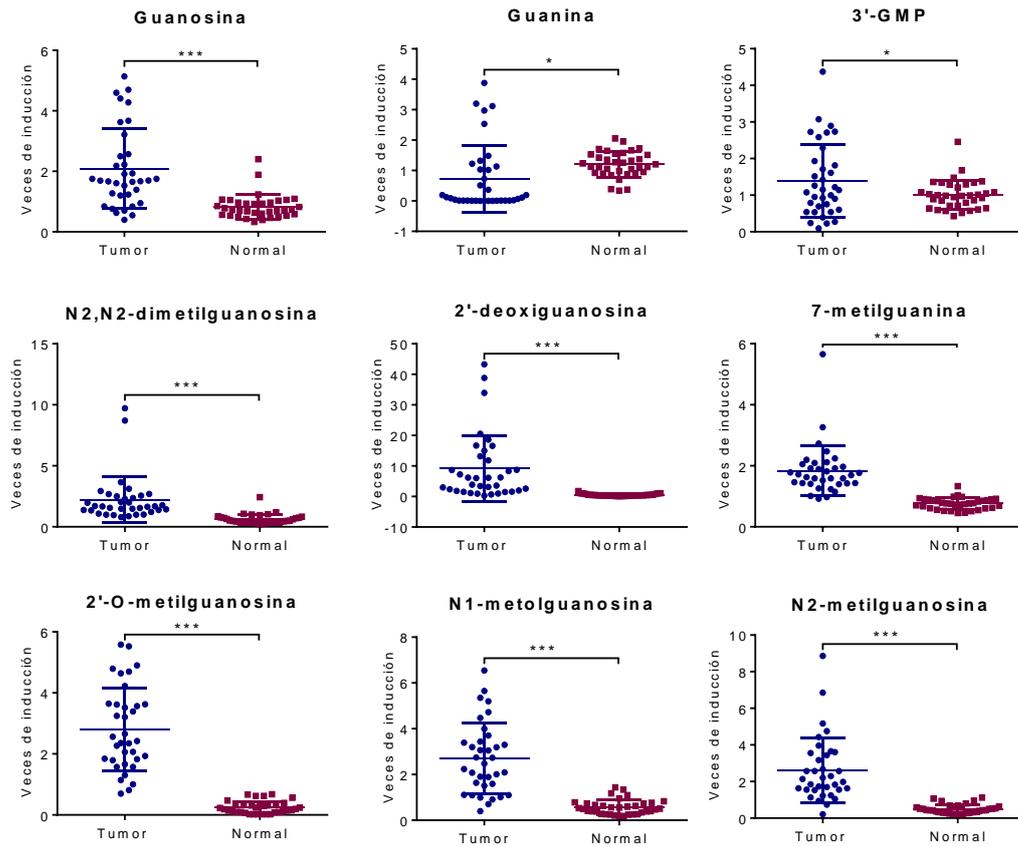


Figura 7: Análisis de los metabolitos de la ruta de las purinas que contienen Guanosina. Para determinar diferencias estadísticas entre las muestras procedentes de tejidos de carcinoma epidermoide de pulmón (Azul) y tejido pulmonar normal (Rosa). Los datos fueron sujetos al test t-Student de muestras pareadas con dos colas. Diferencias significativas se marcan con nivel de significancia $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Nombre del Metabolito	HMDB	FC Tumor Normal
Metabolismo de las purinas, contienen (Hypo)Xantina/Inosina		
Inosina 5'-trifosfato	HMDB00189	-3,7
Inosina	HMDB00195	2,75
Hypoxantina	HMDB00157	1,69
Xantina	HMDB00292	4,35
Xantosina 5'-monofosfato (XMP)	HMDB01554	39,29
Xantosina	HMDB00299	2,75
Urato	HMDB00289	-1,01
Alantoína	HMDB00462	-2,5
Metabolismo de las purinas, contienen Adenina		
Adenosina 5'-difosfato (ADP)	HMDB01341	4,72
Adenosine 5'-monofosfato (AMP)	HMDB00045	8,26
Adenosina 3'-monofosfato (3'-AMP)	HMDB03540	2,51
Adenosina 2'-monofosfato (2'-AMP)	HMDB11617	3,86
Adenosina 3',5'-cyclic monofosfato (cAMP)	HMDB00058	1,89
Adenosina 3',5'-difosfato	HMDB00061	1,88
Adenilosuccinato	HMDB00536	72,17
Adenosina	HMDB00050	1,58
Adenina	HMDB00034	3,16
N1-metiladenosina	HMDB03331	2,36
N6-metiladenosina	HMDB04044	1,8
N6,N6-dimetiladenosina		7,94
N6-carbamoyltreosiladenosina	HMDB41623	6,04
2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato	HMDB00905	12,49
N6-succiniladenosina	HMDB00912	3,66
Metabolismo de las purinas, contienen Guanina		
Guanosina	HMDB00133	2,52
Guanina	HMDB00132	-1,67
7-metilguanina	HMDB00897	2,41
2'-O-metilguanosina		11,38
N1-metilguanosina	HMDB01563	4,74
N2-metilguanosina	HMDB05862	5,25
N2,N2-dimetilguanosina	HMDB04824	3,55
2'-deoxyguanosina	HMDB00085	18,92

Tabla 6: Metabolitos derivados del metabolismo de las purinas. Fold Change (FC): ratio de intensidad de cada metabolito en tejidos de carcinoma epidermoides de pulmón, en comparación con el tejido normal pulmonar. Rojo: Niveles incrementados significativamente (FC > 1.5); Verde: Niveles disminuidos significativamente (FC < 1.5).

De manera general, y como se resume en la figura 8, observamos un aumento significativo en el tejido tumoral de los niveles de los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato (ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, xilulosa-5-fosfato), sustrato inicial en la ruta de las purinas. También apareció un aumento significativo de los primeros productos de esta ruta como AMP (Adenosina 5-Monofosfato) y XMP (Xantosina 5-Monofosfato). Encontramos igualmente la existencia en tumores de niveles elevados de múltiples productos del catabolismo de las purinas como inosina, hipoxantina, xantina y xantosina, así como un acúmulo de adenosina y guanosina. Por el contrario, cabe destacar que no encontramos cambios significativos en la expresión de urato, producto de degradación del metabolismo de las purinas. Del mismo modo, en cuanto al precursor principal de esta ruta, el IMP, no se ha detectado un aumento representativo, al igual que lo ocurrido con el metabolito GMP. Niveles elevados de los metabolitos de las purinas, uridina y citidina, se vieron acompañados de los catabolitos uracil, dihidrouracil y beta-alanina.

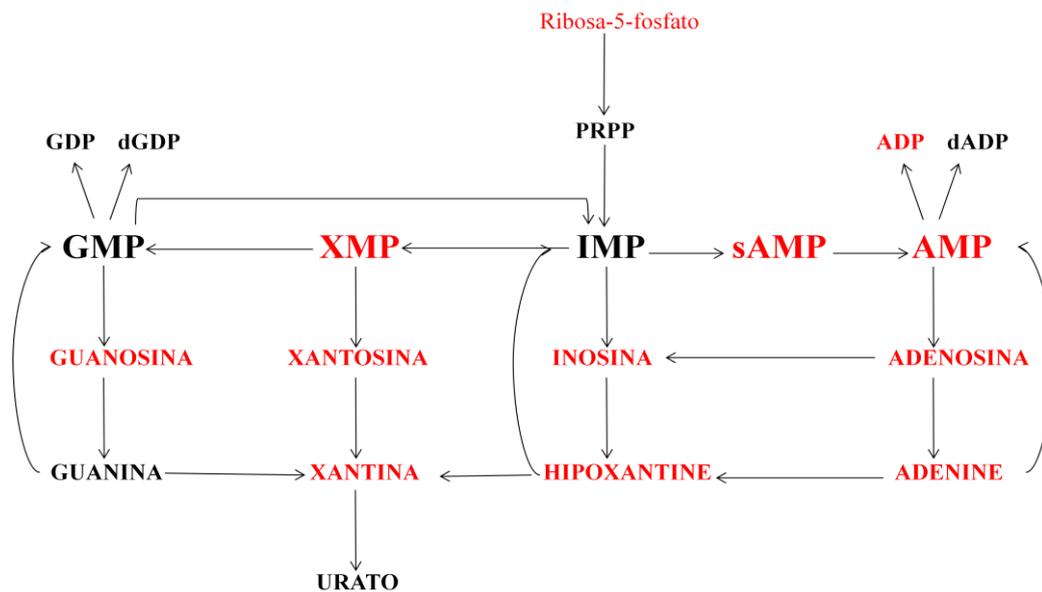


Figura 8: Ruta principal del metabolismo de las purinas. En rojo se marcan aquellos metabolitos que se han detectado sobreexpresados en el análisis metabólico de los pacientes con carcinoma epidermoide.

5.4 Análisis del perfil de expresión génica en el metabolismo de las purinas.

A continuación estuvimos interesados en estudiar en detalle la expresión de las enzimas más relevantes involucradas en la regulación del catabolismo de las purinas, con el fin de asociar su expresión con la regulación de sus correspondiente metabolitos. Para ello seleccionamos un panel de las 10 más importantes en relación a su papel en la ruta (Tabla 7 y Figura 9) y su expresión génica diferencial entre tejido normal y tumoral fue analizada en todos los pacientes

mediante qPCR. Como se muestra en la figura 10, encontramos cambios significativos en la expresión de 8 de los 10 genes, presentando 6 de ellos su expresión disminuida en tumores, mientras en 2 de ellos se encontraba sobre-expresada.

Símbolo	Nombre
<i>ADA</i>	Adenosina deaminasa
<i>IMPDH2</i>	IMP deshidrogenasa 2
<i>GMPS</i>	Guanina monofosfato sintasa
<i>GMPR</i>	Guanina monofosfato reductasa
<i>XDH</i>	Xantina deshidrogenasa
<i>ATIC</i>	IMP ciclohidrolasa
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
<i>ITPA</i>	Inosina trifosfatasa
<i>ADSL</i>	Adenilsuccinato liasa
<i>ADSS</i>	Adenilsuccinato sintasa

Tabla 7: Panel de enzimas estudiadas a nivel de expresión génica diferencial entre tejido normal y tumoral.

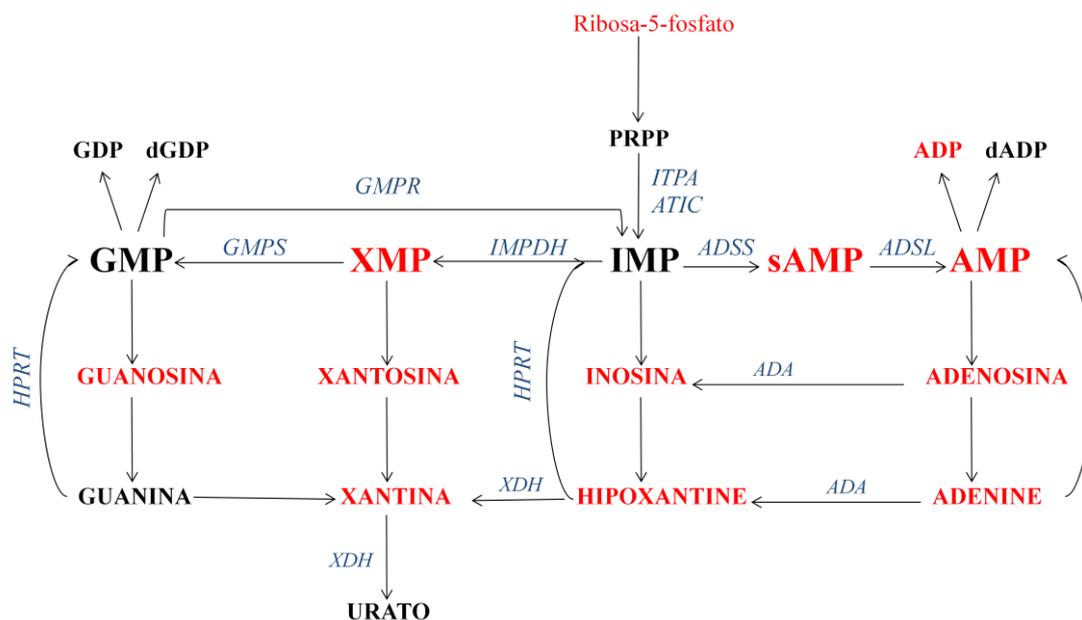


Figura 9: Ruta principal del metabolismo de las purinas. En rojo se marcan aquellos metabolitos que se han detectado sobreexpresados en el análisis metabólico de los pacientes con carcinoma epidermoide. En azul se destacan las enzimas estudiadas participantes de dicha ruta.

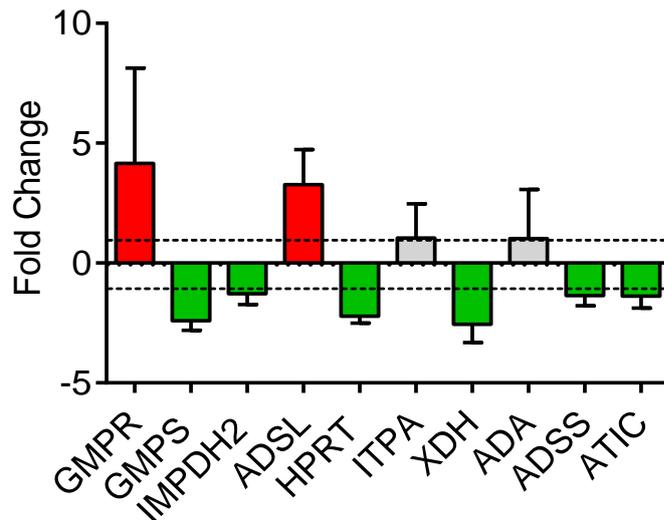


Figura 10: Niveles de expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo de las purinas. Los niveles de los transcritos fueron cuantificados por qRT-PCR en muestras normales y carcinomas epidermoides de pulmón.

5.5 Análisis de la expresión histológica de *ATIC* y *ADSL*.

Debido a la importancia que presenta el purinosoma como posible diana terapéutica para su uso en tratamientos clínicos (Jackson, Hue et al. 2013), decidimos profundizar más en detalle en el análisis de dos enzimas involucradas en él, *ATIC* y *ADSL*, las cuales según las evidencias encontradas en la bibliografía, pueden afectar a la formación y ensamblaje del purinosoma (Baresova, Skopova et al. 2012; Jurecka, Zikanova et al. 2015). Con respecto a *ATIC*, se trata de una enzima limitante de la biosíntesis de purinas, encontrándose en un punto crítico de la ruta donde convierte los niveles acumulados de AICAR a IMP (Wang, Fridman et al. 2009). Además, esta enzima está involucrada en la dirección del flujo hacia AMP o GMP (Zhao, Chiaro et al. 2015). Otra enzima crucial en la ruta de síntesis de purinas es la *ADSL*, la cual además de participar activamente en la formación y ensamblaje del purinosoma, ha sido descrita como una posible diana para la terapia contra el cáncer, ya que su mutación puede provocar una inefectiva interacción entre las otras proteínas del purinosoma, provocando que la funcionalidad del purinosoma disminuya (Zhang, Wang et al. 2015).

Por ello, decidimos analizar su expresión histológica en todas las muestras de pacientes tanto en tejido normal como tumoral. Como se muestra en la figura 11, en el caso de *ATIC* encontramos una buena expresión de la enzima tanto en tejido sano como en tejido tumoral, siendo la localización principalmente citoplasmática. En este caso no se observó una expresión diferencial significativa entre el tejido tumoral y el tejido normal de pulmón. Igualmente, la expresión de *ADSL* presentó una buena intensidad, siendo igualmente mayoritariamente citoplasmática. En este caso, por el

contrario si observamos una clara sobreexpresión de *ADSL* en tejido tumoral con respecto al tejido sano.

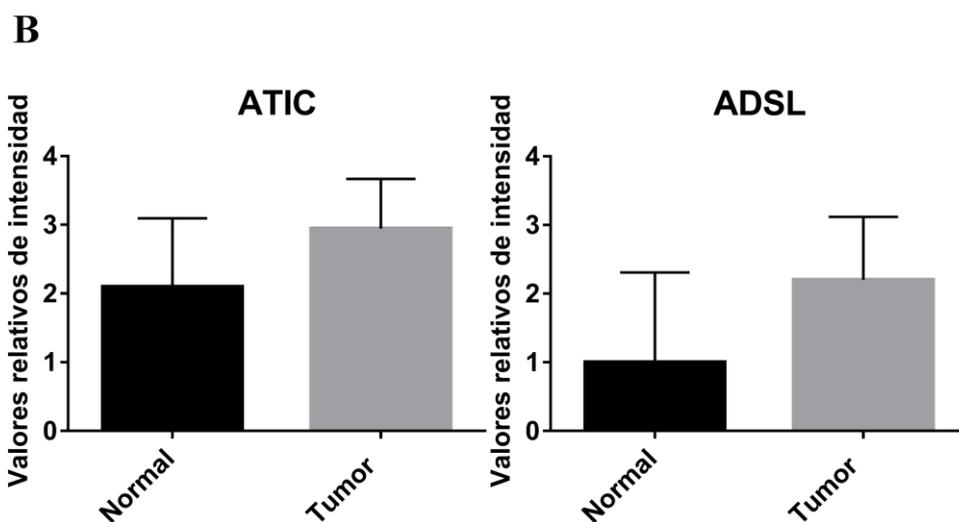
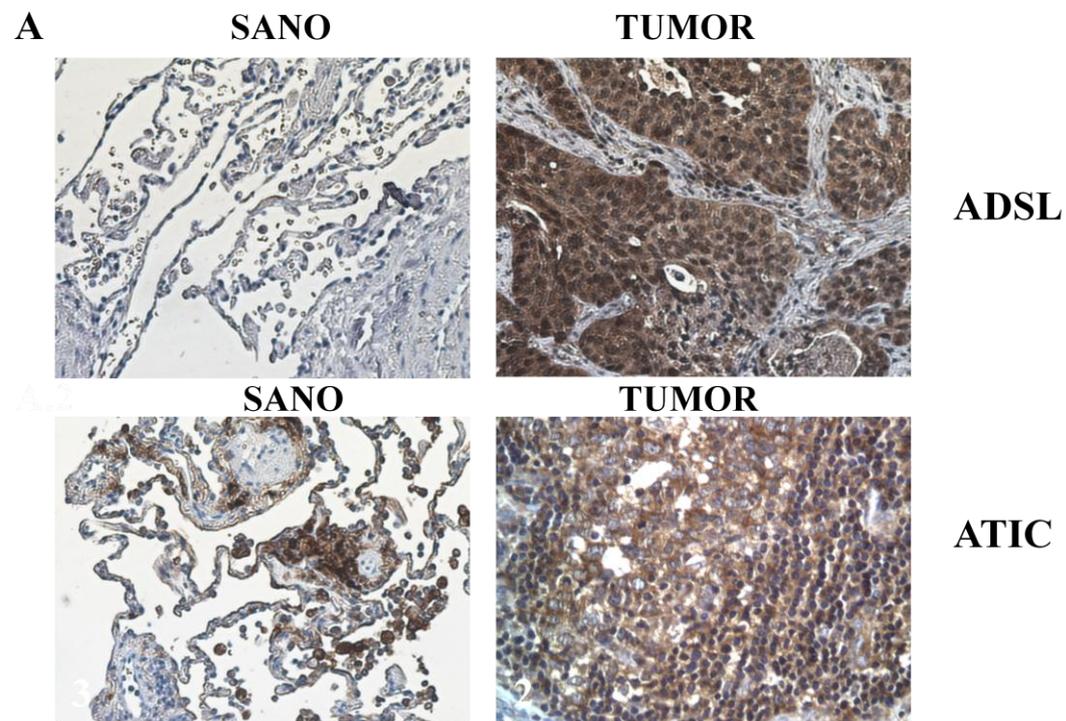


Figura 11: Análisis de la expresión histológica de *ATIC* y *ADSL*. (A) Imágenes representativas de los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido tumoral procedente de carcinoma epidermoide de pulmón y su tejido sano adyacente marcadas con el anticuerpo contra *ADSL* y *ATIC* (x20). (B) Análisis de los niveles de expresión de *ATIC* y *ADSL* en las secciones histológicas de los pacientes seleccionados. Los resultados están expresados como valores relativos de intensidad y representan la media \pm DS.

6. DISCUSIÓN

De manera general, y como se resume en la figura 8, nuestros datos muestran una clara alteración en la expresión de los metabolitos que forman parte de la ruta de las purinas en el tejido tumoral pulmonar comparado con el tejido sano adyacente. Desgranando la ruta desde sus primeros pasos, nuestros datos muestran como en primer lugar observamos un aumento significativo en el tejido tumoral de los niveles de pentosas fosfato, en concreto del sustrato inicial de la ruta de las purinas, la ribosa-5-fosfato. Como consecuencia, es de esperar que el aumento de este precursor vaya a favorecer la activación de la ruta de la síntesis de nucleótidos, y por tanto un aumento de los niveles de los metabolitos intermedios. Tal y como revelan los datos metabólicos presentados en este estudio, las alteraciones observadas en el tejido tumoral corroboran esta hipótesis, demostrando el papel crucial que puede poseer el metabolismo de las purinas sobre el desarrollo y proliferación tumoral. En este sentido, ha sido recientemente descrito que las células tumorales redirigen el flujo glucolítico para generar ribosa-5-fosfato mediante la ribosa-5-fosfato isomerasa (RPI) con el fin de aumentar la síntesis de nucleótidos y mantener una elevada tasa de crecimiento (Ciou, Chou et al. 2015).

A continuación, igualmente detectamos un aumento significativo de los primeros productos metabólicos de la ruta de las purinas, como son el AMP (Adenosina 5-Monofosfato) y XMP (Xantosina 5-Monofosfato). No obstante, cabe destacar el hecho de que el IMP (Inositol Monofosfato) no fuera detectado como un metabolito significativamente alterado en el tejido pulmonar. A pesar de que sus niveles se encontraban muy elevados en ciertos pacientes, este dato no era significativo en toda la población de estudio. Aunque la ausencia de cambios significativos en los niveles de IMP en las muestra de tumor pudiera deberse a un desplazamiento de la ruta hacia XMP y AMP, la ausencia de cambios significativos en la expresión génica de *IMPDH* y *ADSS* no parecen apoyar esta hipótesis. Las diferencias encontradas en la expresión de IMP entre individuos podrían indicar una posible correlación en este caso con el estadio tumoral. En este sentido, estamos interesados en profundizar en la posible correlación entre los niveles de los metabolitos alterados encontrados y las diferentes características clínico-patológicas de cada paciente.

A la luz de estas observaciones, también nos llamó la atención la ausencia de cambios significativos en los niveles de GMP (Guanosín Monofosfato), mientras que por el contrario, sí aparecían cambios significativos en los niveles de AMP (Adenosín Monofosfato). El aumento de los niveles de AMP en muestras tumorales con respecto al tejido sano parecían indicar un desplazamiento de la ruta favoreciendo la síntesis de este metabolito intermedio. El análisis de la expresión diferencial de las diferentes enzimas implicadas en la ruta, demostró un incremento

significativo en la expresión *GMPR* y *ADSL* en carcinomas epidermoides con respecto al tejido normal. La enzima *GMPR* cataliza una reacción reversa la cual convierte GMP a IMP, manteniendo los niveles altos del metabolito IMP, precursor tanto de AMP como de GMP en la ruta de síntesis de purinas. Si bien es cierto que los niveles de IMP no se encontraron alterados, nuestros datos muestran claramente un aumento de los niveles de AMP y ADP. Apoyando estos resultados, encontramos igualmente un sobreexpresión de *ADSL*, enzima regulada y encargada de la síntesis de AMP. Ha sido anteriormente descrito como el gen *GMPR* se encuentra desregulado en células de melanoma en estadios de alta invasión (Hoek et al., 2006), pero con baja proliferación. Nuestros datos demuestran un aumento de su expresión en carcinomas epidermoides, la cual podría estar asociada con el desarrollo tumoral. Esto podría explicarse ya que las muestras usadas en este estudio provienen de pacientes fundamentalmente en estadios primarios IA y IB (Tabla 3), donde *GMPR* puede ser activada para permitir la proliferación tumoral, desplazando la síntesis de IMP para favorecer el aumento de los niveles de AMP. Sin embargo, podría ocurrir que en estadios más avanzados, la desregulación de *GMPR* se llevara a cabo para permitir la invasión tumoral.

El cambio observado en la expresión génica de *ADSL* y la aparente desviación de la ruta hacia la producción de AMP, nos llevó a estudiar mucho más en detalle la expresión en tejido de esta enzima. *ADSL* cataliza dos reacciones: la escisión de fumarato del ribótido succinilaminoimidazol carboxamida (SAICA) para dar el ribótido aminoimidazol carboxamida (AICA) y la escisión del fumarato del adenilsuccinato para dar AMP. Acompañando al incremento en los niveles de AMP detectados en tumor, encontramos un claro aumento de los niveles de expresión de *ADSL* en tejido pulmonar con respecto al sano del mismo paciente. Esto de nuevo viene a demostrar la existencia de una activación de la síntesis *de novo*, lo cual terminará en el aumento de la disponibilidad de ADP y ATP, situación esperable en células con alto consumo metabólico como son las células tumorales.

Más recientemente, la enzima *ADSL* se ha visto involucrada con la formación de un complejo denominado purinosoma. Tal y como hemos comentado en la introducción, este complejo está formado por 6 enzimas encargadas de llevar a cabo en diez reacciones secuenciales el paso de PRPP a IMP (An, Kumar et al. 2008). El purinosoma se forma bajo situaciones de alta demanda de purinas con el fin de incrementar el flujo metabólico de la síntesis *de novo* y complementar la vía de recuperación. Aunque en algunos aspectos la existencia de este complejo es aún debatible, la existencia de alteraciones en la ruta biosintética *de novo* de las purinas en varias enfermedades humanas, ha provocado que el purinosoma sea considerado como una diana terapéutica para su uso en tratamientos clínicos (Zhao, Tsechansky et al. 2014), además de como posible diana en la terapia en oncología (Zhang, Sun et al. 2015). En este sentido, había sido descrito con anterioridad que la

deficiencia de *ADSL* y *ATIC* afecta la formación y ensamblaje del purinosoma (Baresova, Skopova et al. 2012; Jurecka, Zikanova et al. 2015), existiendo evidencias de que ambas enzimas son claves en la regulación de la ruta de síntesis de purinas durante el desarrollo tumoral (An, Kumar et al. 2008; Chan, Zhao et al. 2015; Zhao, Chiaro et al. 2015). Por todo ello, en nuestro trabajo hemos analizado sus expresiones génicas e histológicas en secciones de pulmón y tejido sano del mismo paciente. Tal y como se recogen en los resultados obtenidos, no existen evidencias de que la expresión de *ATIC* se encuentre alterada. Por el contrario, la enzima *ADSL* se ve sobreexpresada tanto a nivel génico como a nivel proteico en tejido pulmonar, lo que corrobora la potencialidad de dicha enzima para convertirse en una posible diana terapéutica contra el cáncer de pulmón.

En el análisis de la última etapa del metabolismo de las purinas también hemos detectado en los tumores un aumento de los niveles de metabolitos como inosina, hipoxantina, xantina y xantosina, así como un acúmulo de adenosina y guanosina. Por el contrario, no detectamos cambios en los niveles del producto final del metabolismo de las purinas en humanos, el ácido úrico o urato monosódico. En este aspecto, la relación del ácido úrico con el cáncer aún no se encuentra esclarecida, ya que aunque en teoría el aumento de los niveles de ácido úrico podría ser preventivo debido a sus efectos antioxidantes, hay resultados que indican que la hiperuricemia aumenta el riesgo de cáncer y la mortalidad de los pacientes afectados (Fini, Elias et al. 2012). En cuanto al cáncer de pulmón más concretamente, no existen muchas investigaciones sobre la relación entre los niveles de ácido úrico y el pronóstico, por lo que aún es cuestionable su asociación. Bozkir et al. (Bozkir, Simsek et al. 1999) detectaron que los niveles de ácido úrico en suero de pacientes con cáncer de pulmón con respecto a sujetos control sanos fueron significativamente más bajos. Otros estudios como el realizado por Willet et al. (Willet and MacMahon 1984) identificaron un descenso de los niveles de ácido úrico sérico en 672 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón, causando una mayor tasa de mortalidad. Sin embargo, no detectaron esta asociación entre los bajos niveles de ácido úrico y la tasa de mortalidad en otros tipos de tumores.

En conclusión, nuestros datos claramente demuestran la existencia de alteraciones metabólicas asociadas al cáncer de pulmón involucradas en el metabolismo de las purinas. Estos cambios producen una alteración en la ruta que provoca activación de la síntesis *de novo*, lo cual terminará en el aumento de la disponibilidad de ADP y ATP. Aunque posteriores análisis serán llevados a cabo para correlacionar la expresión de estos metabolitos, así como de las enzimas encargadas de su metabolismo, con la clínica de los pacientes, los datos obtenidos abren las puertas a su uso como marcadores de la enfermedad, tanto pronóstico como diagnóstico. Dentro de las enzimas responsables de los diferentes pasos de control de la ruta, *ADSL* se ve sobreexpresada en

tumores, proponiéndose como posible diana terapéutica contra el cáncer de pulmón. La inhibición de esta enzima podría disminuir la disponibilidad de ATP celular, impidiendo por tanto el desarrollo tumoral.

7. CONCLUSIONES

- Tal y como revelan los datos metabólicos, en este estudio se observaron alteraciones en la mayoría de los metabolitos involucrados en el metabolismo de las purinas en carcinomas epidermoides con respecto al tejido normal de pulmón, además de un incremento del precursor ribosa-5-fosfato, corroborando el papel crucial que poseen las purinas en el desarrollo y proliferación tumoral.
- Sólo dos enzimas, *GMPR* y *ADSL*, tuvieron un incremento significativo a nivel de expresión génica en carcinomas epidermoides con respecto al tejido normal.
- La enzima *ADSL* se ve sobreexpresada tanto a nivel génico como a nivel proteico en tejido pulmonar, lo que corrobora la potencialidad de dicha enzima para convertirse en diana para la terapia del cáncer de pulmón. Además la activación de *ADSL* y la desregulación de la enzima de la ruta de recuperación *HGPRT* parecen indicar que la ruta preferente de la síntesis de purinas es mediante la ruta de *nov*o, donde el flujo podría verse estimulado por la formación del purinosoma.
- A pesar de las evidencias existentes, no se ha detectado alteración en la expresión de *ATIC* en carcinomas epidermoides de cáncer de pulmón.
- La monitorización de los niveles de metabolitos involucrados en el metabolismo de las purinas podrían ser empleados como nuevos marcadores de diagnóstico y/o pronóstico en el cáncer de pulmón.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikary, S. and M. Eilers (2005). "Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 635-645.
- An, S., R. Kumar, et al. (2008). "Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells." *Science* 320(5872): 103-106.
- Baresova, V., V. Skopova, et al. (2012). "Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency." *Hum Mol Genet* 21(7): 1534-1543.
- Bass, A. J., H. Watanabe, et al. (2009). "SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas." *Nat Genet* 41(11): 1238-1242.
- Beckonert, O., M. Coen, et al. (2010). "High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues." *Nat Protoc* 5(6): 1019-1032.
- Bertolini, G., L. Roz, et al. (2009). "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38): 16281-16286.
- Bozkir, A., B. Simsek, et al. (1999). "Ascorbic acid and uric acid levels in lung cancer patients." *J Clin Pharm Ther* 24(1): 43-47.
- Brambilla, E., W. D. Travis, et al. (2001). "The new World Health Organization classification of lung tumours." *Eur Respir J* 18(6): 1059-1068.
- Cairns, J. (2006). "Cancer and the immortal strand hypothesis." *Genetics* 174(3): 1069-1072.
- Calderon-Santiago, M., F. Priego-Capote, et al. (2015). "Human sweat metabolomics for lung cancer screening." *Anal Bioanal Chem* 407(18): 5381-5392.
- Carpagnano, G. E., G. P. Palladino, et al. (2008). "[New biomolecular methodologies in diagnosis of lung cancer]." *Recenti Prog Med* 99(9): 417-421.
- Carretero, J., P. P. Medina, et al. (2004). "Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene." *Oncogene* 23(22): 4037-4040.
- Ciou, S. C., Y. T. Chou, et al. (2015). "Ribose-5-phosphate isomerase A regulates hepatocarcinogenesis via PP2A and ERK signaling." *Int J Cancer* 137(1): 104-115.
- Collins, L. G., C. Haines, et al. (2007). "Lung cancer: diagnosis and management." *Am Fam Physician* 75(1): 56-63.
- Chan, C. Y., H. Zhao, et al. (2015). "Purinosome formation as a function of the cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(5): 1368-1373.
- Dang, C. V. (2012). "Links between metabolism and cancer." *Genes Dev* 26(9): 877-890.
- Danial, N. N., C. F. Gramm, et al. (2003). "BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis." *Nature* 424(6951): 952-956.
- Deng, C., X. Zhang, et al. (2004). "Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 808(2): 269-277.
- Di Virgilio, F. (2012). "Purines, purinergic receptors, and cancer." *Cancer Res* 72(21): 5441-5447.

- Dolle, C., R. H. Skoge, et al. (2013). "NAD biosynthesis in humans--enzymes, metabolites and therapeutic aspects." *Curr Top Med Chem* 13(23): 2907-2917.
- Dwivedi, P., G. Puzon, et al. (2010). "Metabolic profiling of *Escherichia coli* by ion mobility-mass spectrometry with MALDI ion source." *J Mass Spectrom* 45(12): 1383-1393.
- Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* 15(3): 504-514.
- Fan, T. W., A. N. Lane, et al. (2009). "Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM)." *Mol Cancer* 8: 41.
- Feinstein, A. R. and C. K. Wells (1990). "A clinical-severity staging system for patients with lung cancer." *Medicine (Baltimore)* 69(1): 1-33.
- Feng, Q., S. E. Hawes, et al. (2008). "DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(3): 645-654.
- Fernie, A. R., R. N. Trethewey, et al. (2004). "Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 763-769.
- Fiehn, O. (2001). "Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks." *Comp Funct Genomics* 2(3): 155-168.
- Fini, M. A., A. Elias, et al. (2012). "Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality." *Clin Transl Med* 1(1): 16.
- Gessi, S., S. Merighi, et al. (2011). "Adenosine receptors and cancer." *Biochim Biophys Acta* 1808(5): 1400-1412.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, et al. (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." *Nat Med* 15(10): 1170-1178.
- Goswami, M. T., G. Chen, et al. (2015). "Role and regulation of coordinately expressed de novo purine biosynthetic enzymes PPAT and PAICS in lung cancer." *Oncotarget*.
- Gottle, M., H. Burhenne, et al. (2013). "Purine metabolism during neuronal differentiation: the relevance of purine synthesis and recycling." *J Neurochem* 127(6): 805-818.
- Gowda, G. A., S. Zhang, et al. (2008). "Metabolomics-based methods for early disease diagnostics." *Expert Rev Mol Diagn* 8(5): 617-633.
- Guo, Y., X. Wang, et al. (2012). "Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." *Clin Chim Acta* 414: 135-141.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hassanein, M., J. C. Callison, et al. (2012). "The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer." *Cancer Prev Res (Phila)* 5(8): 992-1006.
- Heguy, A., T. P. O'Connor, et al. (2006). "Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking." *J Mol Med (Berl)* 84(4): 318-328.
- Hensley, C. T. and R. J. DeBerardinis (2015). "In vivo analysis of lung cancer metabolism: nothing like the real thing." *J Clin Invest* 125(2): 495-497.
- Hitchings, G. H. and G. B. Elion (1954). "The chemistry and biochemistry of purine analogs." *Ann N Y Acad Sci* 60(2): 195-199.

- Hori, S., S. Nishiumi, et al. (2011). "A metabolomic approach to lung cancer." *Lung Cancer* 74(2): 284-292.
- Houston, K. A., S. J. Henley, et al. (2014). "Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004-2009." *Lung Cancer* 86(1): 22-28.
- Jackson, L. M., J. J. Hue, et al. (2013). "Quantitative Detection of Purines in Biologically-Relevant Films with TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry." *Surf Interface Anal* 45(1): 237-239.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Jurecka, A., M. Zikanova, et al. (2015). "Adenylosuccinate lyase deficiency." *J Inherit Metab Dis* 38(2): 231-242.
- Kalluri, U., M. Naiker, et al. (2014). "Cell culture metabolomics in the diagnosis of lung cancer-the influence of cell culture conditions." *J Breath Res* 8(2): 027109.
- Kelly, A. D., S. B. Breitkopf, et al. (2011). "Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma." *PLoS One* 6(10): e25357.
- Kim, H. U., T. Y. Kim, et al. (2008). "Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms." *Mol Biosyst* 4(2): 113-120.
- Kureshi, N., S. S. Abidi, et al. (2014). "A Predictive Model for Personalized Therapeutic Interventions in Non-small Cell Lung Cancer." *IEEE J Biomed Health Inform*.
- Kurup, A. and P. J. Loehrer, Sr. (2004). "Thymoma and thymic carcinoma: therapeutic approaches." *Clin Lung Cancer* 6(1): 28-32.
- Ledesma-Amaro, R., R. M. Buey, et al. (2015). "Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*." *Microb Cell Fact* 14(1): 58.
- Li, S. X., Y. P. Tong, et al. (2007). "Octameric structure of the human bifunctional enzyme PAICS in purine biosynthesis." *J Mol Biol* 366(5): 1603-1614.
- Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." *Nature* 411(6835): 375-379.
- Liu, H., H. Wang, et al. (2014). "Investigation of volatile organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 945-946: 53-59.
- Liu, Y. C., F. Li, et al. (2008). "Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc." *PLoS One* 3(7): e2722.
- Lortet-Tieulent, J., I. Soerjomataram, et al. (2014). "International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women." *Lung Cancer* 84(1): 13-22.
- Mannava, S., V. Grachtchouk, et al. (2008). "Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells." *Cell Cycle* 7(15): 2392-2400.
- Miyamoto, S., S. L. Taylor, et al. (2015). "Systemic Metabolomic Changes in Blood Samples of Lung Cancer Patients Identified by Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Metabolites* 5(2): 192-210.
- Mohamed, A., X. Deng, et al. (2014). "Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer." *Clin Lung Cancer* 15(1): 7-15.
- Munshi, P. N., M. Lubin, et al. (2014). "6-thioguanine: a drug with unrealized potential for cancer therapy." *Oncologist* 19(7): 760-765.

- Musharraf, S. G., S. Mazhar, et al. (2015). "Plasma metabolite profiling and chemometric analyses of lung cancer along with three controls through gas chromatography-mass spectrometry." *Sci Rep* 5: 8607.
- Noell, C. W. and R. K. Robins (1962). "The Antitumor Activity of 2-Amino-6-Alkylthio-9-(Beta-Dribofuranosyl)purines and Related Derivatives of 2-Amino-6-Purinethiol (Thioguanine)." *J Med Pharm Chem* 91: 1074-1085.
- Nordstrom, A. and R. Lewensohn (2010). "Metabolomics: moving to the clinic." *J Neuroimmune Pharmacol* 5(1): 4-17.
- O'Connell, J. D., A. Zhao, et al. (2012). "Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies." *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 89-111.
- Pastor-Anglada, M. and S. Perez-Torras (2015). "Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets." *Front Pharmacol* 6: 13.
- Patti, G. J., O. Yanes, et al. (2012). "Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4): 263-269.
- Phillips, M., N. Altorki, et al. (2007). "Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath." *Cancer Biomark* 3(2): 95-109.
- Pospisilova, J., O. Vit, et al. (2013). "Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes." *Int J Mol Med* 31(5): 1273-1279.
- Putri, S. P., Y. Nakayama, et al. (2013). "Current metabolomics: practical applications." *J Biosci Bioeng* 115(6): 579-589.
- Rossi, A., P. Maione, et al. (2005). "Treatment of small cell lung cancer in the elderly." *Oncologist* 10(6): 399-411.
- Saito, M., A. J. Schetter, et al. (2011). "The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts." *Clin Cancer Res* 17(7): 1875-1882.
- Schwarz, S., B. Siewert, et al. (2015). "New antitumor 6-chloropurine nucleosides inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest." *Eur J Med Chem* 90: 595-602.
- Sekido, Y., K. M. Fong, et al. (2003). "Molecular genetics of lung cancer." *Annu Rev Med* 54: 73-87.
- Sozzi, G. and M. Boeri (2014). "Potential biomarkers for lung cancer screening." *Transl Lung Cancer Res* 3(3): 139-148.
- Spratlin, J. L., N. J. Serkova, et al. (2009). "Clinical applications of metabolomics in oncology: a review." *Clin Cancer Res* 15(2): 431-440.
- Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2011). "CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis." *Cancer Res* 71(8): 2892-2900.
- Sutherland, R. M., J. S. Rasey, et al. (1988). "Tumor biology." *Am J Clin Oncol* 11(3): 253-274.
- Travis, W. D., E. Brambilla, et al. (2013). "New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials." *J Clin Oncol* 31(8): 992-1001.
- Tsai, M. F., C. C. Wang, et al. (2014). "Tumour suppressor HLJ1: A potential diagnostic, preventive and therapeutic target in non-small cell lung cancer." *World J Clin Oncol* 5(5): 865-873.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* 324(5930): 1029-1033.
- Wang, W., A. Fridman, et al. (2009). "The phosphatidylinositol 3-kinase/akt cassette regulates purine nucleotide synthesis." *J Biol Chem* 284(6): 3521-3528.

- Want, E. J., P. Masson, et al. (2013). "Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS." *Nat Protoc* 8(1): 17-32.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314.
- Wardwell, N. R. and P. P. Massion (2005). "Novel strategies for the early detection and prevention of lung cancer." *Semin Oncol* 32(3): 259-268.
- Willett, W. C. and B. MacMahon (1984). "Diet and cancer--an overview (second of two parts)." *N Engl J Med* 310(11): 697-703.
- Wise, D. R. and C. B. Thompson (2010). "Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer." *Trends Biochem Sci* 35(8): 427-433.
- Wistuba, II, A. F. Gazdar, et al. (2001). "Molecular genetics of small cell lung carcinoma." *Semin Oncol* 28(2 Suppl 4): 3-13.
- Yuan, L., L. X. Liu, et al. (2010). "The advancement of predictive diagnosis and molecular mechanism in multiple primary lung cancer." *Chin J Cancer* 29(5): 575-578.
- Zhang, A., H. Sun, et al. (2015). "Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic." *Biomed Res Int* 2015: 354671.
- Zhang, J., Y. Wang, et al. (2015). "Characterizing and optimizing human anticancer drug targets based on topological properties in the context of biological pathways." *J Biomed Inform* 54: 132-140.
- Zhao, A., M. Tsechansky, et al. (2014). "Revisiting and revising the purinosome." *Mol Biosyst* 10(3): 369-374.
- Zhao, H., C. R. Chiaro, et al. (2015). "Quantitative analysis of purine nucleotides indicates that purinosomes increase de novo purine biosynthesis." *J Biol Chem* 290(11): 6705-6713.
- Zhao, H., J. B. French, et al. (2013). "The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans." *Chem Commun (Camb)* 49(40): 4444-4452.
- Zhou, C. (2014). "Lung cancer molecular epidemiology in China: recent trends." *Transl Lung Cancer Res* 3(5): 270-279.