

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Utilidad del estudio de pérdidas de heterocigosidad
en los genes p53, p16 y APC en muestras de
cavidad oral como marcadores de riesgo para
carcinoma broncogenético**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco José Roig Vázquez

Directores:

**Luis Callol Sánchez
José Javier Jareño Estaban**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-8495-1

© Francisco José Roig Vázquez, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**UTILIDAD DEL ESTUDIO DE PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD EN LOS GENES
p53, p16 Y APC EN MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL COMO MARCADORES DE
RIESGO PARA CARCINOMA BRONCOGÉNICO.**

Francisco José Roig Vázquez

MADRID, 2010.

D. Luis Callol Sánchez, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA

Que D. Francisco José Roig Vázquez, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“UTILIDAD DEL ESTUDIO DE PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD EN LOS GENES p53, p16 Y APC EN MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL COMO MARCADORES DE RIESGO PARA CARCINOMA BRONCOGÉNICO.”**

Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado

Madrid a 1 de Septiembre de 2010.

Fdo: Dr Luis Callol Sánchez.

D. José Javier Jareño Esteban, Doctor en Medicina y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA

Que D. Francisco José Roig Vázquez, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“UTILIDAD DEL ESTUDIO DE PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD EN LOS GENES p53, p16 Y APC EN MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL COMO MARCADORES DE RIESGO PARA CARCINOMA BRONCOGÉNICO.”**

Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado

Madrid a 1 de Septiembre de 2010.

Fdo: Dr José Javier Jareño Esteban.

A Marisa y mi familia

Agradecimientos

Desde que nació la idea de realizar la Tesis hasta ver culminada su elaboración, han participado en ella muchas personas, dentro y fuera del ámbito médico a las que no tengo por más que agradecer su inestimable ayuda y colaboración pero deseo dar de un modo especial mi agradecimiento:

Al Dr. Luis Callol Sánchez, co-director de la Tesis, por su amistad, apoyo y confianza que siempre me transmitió de forma tenaz para lograr terminar este proyecto.

Al Dr. José Javier Jareño Esteban, co-director de la Tesis y antiguo tutor de mi residencia que desde muy temprano me transmitió su amistad y compañerismo, apoyándome en todo momento en la elaboración de la Tesis.

Al Dr. Santiago Coca Menchero y los miembros de su equipo del Servicio de Anatomía Patológica por su inestimable colaboración para la realización de la Tesis

Al Dr. Francisco Javier Gómez de Terreros por su larga amistad y continuo estímulo para la elaboración de este proyecto

Al Dr. Julián Sanz Ortega por su valiosa colaboración y experiencia que hizo que este proyecto finalmente pudiera ver la luz.

A María Ángeles Muñoz Lucas y Belén Carrillo mi agradecimiento por su amistad y desinteresada colaboración, que tuvieron que sufrir los momentos más difíciles.

A todos mis antiguos compañeros del Servicio de Neumología del Hospital Central de la Defensa, mi agradecimiento por su amistad, apoyo y compañerismo en el trabajo.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AJCC: Comité Americano Contra el Cáncer.

ANOVA: Análisis de varianza.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

ATS: American Thoracic Society.

C: Citosina.

CDK4: Ciclina D1 Kinasa 4 ciclino dependiente.

CDKs: Quinasas dependientes de ciclina.

CK: Citoqueratina.

COL: Colagenasa.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

ERS: European Respiratory Society.

G: Guanina.

GRP/BN: Péptido gastrina bombesina.

IASLC: Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón.

MMP: Metaloproteasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR. Odds Ratio

PDH: Pérdida de Heterocigosidad.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

TF: Factor de transcripción.

TGF alfa: Factor de Crecimiento Alfa.

TNM: Clasificación TNM

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO	10
MORTALIDAD.....	10
SEXO	10
INCIDENCIA.....	11
DISTRIBUCIÓN DE ESTIRPES HISTOLÓGICAS.....	11
TABAQUISMO Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	12
SUPERVIVENCIA	14
CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	15
ESTADIFICACIÓN DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO. CLASIFICACIÓN TNM 1997 (AJCC-UICC-SEPAR) ..	16
ESTADIOS TNM.....	22
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	23
ONCOGENES	28
GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	32
PRINCIPALES ANORMALIDADES MOLECULARES EN EL CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	36
ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y GENÉTICAS.INESTABILIDAD DEL GENOMA.....	36
MODIFICACIÓN EPIGENÉTICA DEL ADN POR HIPERMETILACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS	39
ACTIVIDAD TELOMERASA	40
POTENCIALES BIOMARCADORES EN EL CRIBADO DE CARCINOMA BRONCOGÉNICO	41
PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD (PDH) EN GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	41
METILACIÓN ABERRANTE.....	41
EXPRESIÓN TELOMERASA.....	41
MATRICES DE EXPRESIÓN GENÉTICA.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS.....	46
METODOLOGÍA	47
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111

INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

MORTALIDAD

Los datos de mortalidad por cáncer en España, publicados por el Centro Nacional de Epidemiología (1) reflejan que el número de defunciones por cáncer de pulmón en el año 2008 fue de 17.146 varones (un 0.2% menos que en el año 2007) y 3.049 mujeres (un 9% más que en el año 2007) confirmando su evolución ascendente principalmente entre las mujeres. De este modo, esta patología, se convierte en la principal causa de mortalidad por cáncer entre los varones mientras que en las mujeres ocupa el 3º lugar después del cáncer de mama y de colon.

La mortalidad por cáncer de pulmón empieza a tener importancia como causa de muerte a partir de los 35 a 44 años en ambos sexos. En los hombres la tendencia es creciente especialmente entre los 45 a 54 años. En las mujeres con una mortalidad 10 veces inferior a la de los hombres por esta causa, la tendencia es también creciente sobre todo en las edades más jóvenes: de 35 a 44 años, en los que la mortalidad por esta causa aumentó un 47% en la última década.

SEXO

Los últimos estudios sobre la incidencia de cáncer de pulmón entre población no fumadora parecen indicar que es más elevada entre las mujeres (2, 3) y en el caso de la población fumadora, los datos apuntan , con algunas controversias, a que la

mujer podría ser algo más vulnerable al efecto carcinógeno del tabaco (4-6). La diferente incidencia de mortalidad entre hombres y mujeres fumadoras se explicaría fundamentalmente por la tardía introducción del tabaquismo de éstas últimas. Las mujeres se iniciaron en el consumo de tabaco a partir de los años 60 en tanto que los varones se iniciaron a partir de los años 20. Según los datos publicados (año 2006) de la Encuesta Nacional de Salud de España (ENSE) año 2006, el porcentaje de fumadores es de 31,6% en los hombres y del 21,5% en la mujeres.

INCIDENCIA

Recientemente se han publicado los resultados de varios estudios de incidencia en nuestro país pero es de destacar el estudio EpicliCP-2003 (7), que abarcó centros de 9 regiones españolas. Todos los estudios realizados hasta la fecha corroboran el aumento de casos de carcinoma broncogénico en mujeres.

DISTRIBUCIÓN DE ESTIRPES HISTOLÓGICAS

De forma general existe una tendencia desde los años setenta al aumento de la proporción de adenocarcinomas y a una disminución de los epidermoides. En general la estirpe adenocarcinoma es la que menos vínculo tiene con el tabaquismo siendo los tumores microcíticos los más relacionados con un mayor consumo de tabaco(8). En varios países europeos la estirpe epidermoide, pese a existir un declive porcentual en los últimos 20-30 años, todavía es la más frecuente entre los varones: 37% en Francia, 44% en Polonia y 45% en Holanda en el periodo de

1993-1997(9). Por lo que respecta a nuestro país también se observa una mayoría de tumores epidermoides (37% según el estudio EpicliCP-2003)(7).

TABAQUISMO Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO

Hoy en día se afirma que el tabaco es la principal causa de cáncer de pulmón(3,10). Aproximadamente entre el 80-90% de los casos de cáncer de pulmón son atribuibles al tabaquismo pero sólo un 10-15% de las personas fumadoras llegarán a desarrollar cáncer de pulmón y un 10-15% de todos los cánceres de pulmón ocurren en pacientes no fumadores(11).

La idea de que el tabaco podía estar en relación con el cáncer parece que se remonta a 1716 cuando Hill comunicó el desarrollo de pólipos en mascadores de tabaco, dos de los cuales evolucionaron a lesiones de carácter maligno.

Sabemos que el humo del cigarrillo contiene más de 4.000 sustancias y que al menos el tabaco aporta 2.550 sustancias de las cuales al menos 55 son carcinógenas(12) y que son las nitrosaminas específicas del tabaco las más dañinas. Se forman de la curación, fermentación y envejecimiento del tabaco. Otras sustancias son formaldehído, acetaldehído, hidracida, arsénico, níquel, cadmio, benzopireno, polonio, etc.

Hoy día disponemos de suficientes datos epidemiológicos procedentes de estudios prospectivos del tipo casos-contróles y de cohortes (13-16) que demuestran el papel fundamental que ejerce el tabaco en el origen del cáncer de pulmón. Incluso los fumadores en escasa cuantía tienen un riesgo incrementado que llega a ser entre 4 a 13 veces más alto en consumidores de 1 paquete al día respecto al no

fumador .También parece ser importante la duración del hábito de fumar. Existen evidencias de que el consumo de un paquete de cigarrillos por día durante 40 años se asocia con más riesgo que el consumo de dos paquetes por día durante 20 años (17).

Con respecto al tabaquismo pasivo, estudios epidemiológicos (18) indican que se incrementa el riesgo de cáncer de pulmón y de hecho se ha demostrado la presencia de metabolitos del tabaco en distintas muestras biológicas de los fumadores pasivos y alteraciones genéticas con mayor frecuencia que en las no expuestas (19).

Al menos el 50% de los carcinomas de pulmón se diagnostican en pacientes exfumadores, lo que supone un dato importante para futuros programas en la detección precoz de cáncer de pulmón.

El humo del cigarrillo no es la única causa del carcinoma de pulmón. Un 15% de los cánceres de pulmón no están vinculados a la exposición tabáquica y de éstos el adenocarcinoma es el tipo más común. La exposición a diversos materiales inorgánicos en forma de partículas y sustancias químicas se asocia a un riesgo aumentado de cáncer de pulmón. Entre estas sustancias destacan el asbesto, sílice cristalino, hidrocarburos aromáticos policíclicos, arsénico, níquel, cadmio, compuestos cromados, gas mostaza, berilio y cloruro de vinilo.

SUPERVIVENCIA

El estudio EpicliCP-2003, que proporciona información epidemiológica y clínica del carcinoma broncogénico en España, nos refleja que en el periodo de estudio (2003), la tasa de resección quirúrgica fue de 14.9% y la supervivencia global a 3 años fue de 13.8 años (9).

Por lo que se refiere a los pacientes intervenidos quirúrgicamente, la esperanza de vida parece haber mejorado algo aunque las comparaciones entre centros son difíciles por los tipos de registros y métodos de selección empleados.

Estadio	Mountain (EEUU 1975-1988)		Asamura (Japón 1999)		Pfannschmidt (1996-2005)	
	TNM clinico	TNM patológico	TNM clínico	TNM patológico	TNM clínico	TNM patológico
IA	61,00%	67,00%	58,80%	58,30%		68,50%
IB	38,00%	57,00%	58,00%	6células ,20%		66,60%
IIA	34,00%	55,00%	47,10%	40,60%		55,30%
IIB	24,00%	39,00%	25,30%	41,10%		49,00%
IIIA	13,00%	23,00%	29,00%	28,30%		35,80%
IIIB	5,00%		36,30%	34,60%		35,40%
IV	1,00%		27,80%	30,80%		33,10%

TABLA 1. TABLA COMPARATIVA POR AUTORES DE PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA GLOBAL A LOS 5 AÑOS TRAS CIRUGÍA EN PACIENTES CON CARCINOMA BRONCOGÉNICO.

CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

La primera clasificación histológica del Cáncer de pulmón data de 1924 y la última, que fue propiciada por la OMS y la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (*IASLC*), fue publicada en 1999 y actualizada en 2004.

Carcinoma de células escamosas

- Papilar
- Carcinoma de células escamosas Células claras
- Células pequeñas
- Basaloide

Adenocarcinoma

- Acinar
- Papilar
- Mucinoso
- Bronquioloalveolar
- No Mucinoso
- Mixto
- ADC sólido con formación de moco
- Fetal bien diferenciado
- Mucinoso (coloide)
- Cistoadenocarcinoma
- ADC con variantes Signet-ring
- Células claras

Carcinoma de células grandes

- Carcinoma de células gigantes
- Carcinoma de células claras

Carcinoma Adenoescamoso

Carcinomas neuroendocrinos

- Carcinoide típico
- Carcinoide atípico
- Carcinoma de células pequeñas
- Tipo clásico (“Oat cell” y tipo intermedio)
- Tipo mixto
- Tipo combinado
- Neuroendocrino de células grandes

Linfoepitelioma

Carcinoma tipo salivar

- Carcinoma Mucoepidermoide
- Carcinoma Adenoideo quístico (cilindroma)

Carcinoma basaloide

Carcinoma sarcomatoide

ESTADIFICACIÓN DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO. CLASIFICACIÓN TNM 1997 (AJCC-UICC-SEPAR)

La última edición de la clasificación TNM es la aparecida en 1997, que es idéntica para la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y para el Comité Americano

Contra el Cáncer (AJCC). Esta clasificación ha sido reconocida por la American Thoracic Society (ATS), la European Respiratory Society (ERS) y la SEPAR.

En función del momento en el que se realice la estadificación se emplean las siguientes denominaciones:

TNMc (clínico), resultado de los estudios de imagen, FBC, mediastinoscopia o toracotomía.

TNMq (quirúrgico), en la exploración quirúrgica del paciente intervenido.

TNMp (patológico), en el examen de la pieza reseca.

TNM_r tras realizar un tratamiento de inducción o neoadyuvante.

TNM_{pm} estudio postmortem.

T: Extensión del tumor primario. Se define por el tamaño tumoral, localización endobronquial del tumor y estructuras locales afectadas.

- **T_x:** El tumor primario no puede ser evaluado o tumor demostrado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no visualizado por técnicas de imagen o broncoscopia.
- **T₀:** No hay evidencia de tumor primario
- **T_{is}:** Carcinoma "in situ"
- **T-1:** Tumor de 3 cms o menos en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (esto es, no en el bronquio principal),
- **T-2:** Tumor con cualquiera de las características siguientes de tamaño o extensión: más de 3 cms de diámetro mayor; afectación del bronquio principal, 2 cms o más distal a la carina; invasión de la pleura visceral;

asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, pero no afecta al pulmón entero.

- **T-3:** Cualquier medida tumoral con invasión de pared torácica, diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal, bronquio principal a menos de 2 cm de la carina traqueal, pero sin invadirla o neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero.

- **T-4:** Cualquier medida tumoral con invasión del mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, esófago, cuerpo vertebral, carina, derrame pleural o pericárdico maligno o nódulo (s) tumoral (es) en el mismo lóbulo.

N: Ausencia o presencia de metástasis regionales. Define la ausencia o presencia de afectación ganglionar, y si esta existe, el grado de extensión.

- **Nx:** No se pueden valorar los ganglios linfáticos regionales.

- **N-0:** No existen metástasis en ganglios linfáticos regionales.

- **N-1:** Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.

- **N-2:** Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales o subcarínicos.

- **N-3:** Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.

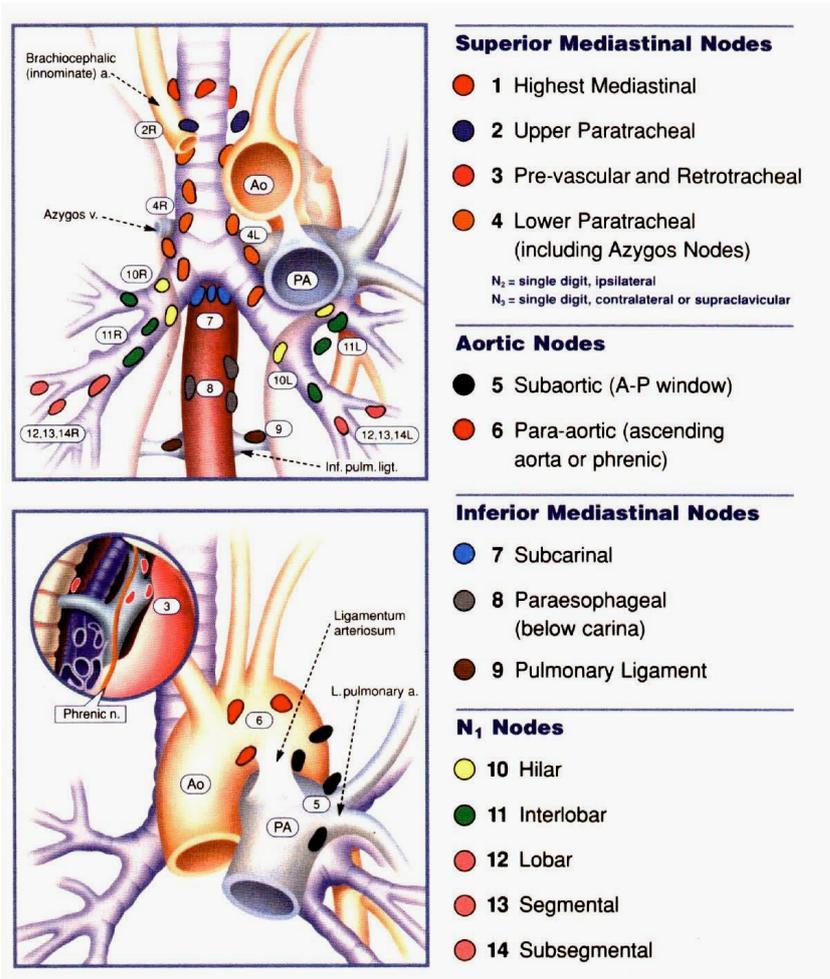


Ilustración 1. Áreas ganglionares en la estadificación del cáncer de pulmón.

Regional lymph node stations for lung cancer staging. Adapted from Naruke et al and the ATS/North American LCSG (copyright 1996, Montain and Dresler may be reproduced for educational purposes without permission)

M: Se refiere a la presencia o no de metástasis a distancia

- **Mx:** No se puede demostrar metástasis a distancia.
- **M-0:** No existen metástasis a distancia.
- **M-1:** Metástasis a distancia, incluye nódulo (s) tumoral (es) en lóbulo diferente, ipsilateral o contralateral.

Situaciones especiales clasificatorias

- Invasión del n. frénico T3
- Parálisis de la cuerda vocal (resultante de invasión de la n. recurrente del nervio vago), obstrucción de la vena cava superior o compresión de la tráquea o del esófago en tumores en tumores centrales T4.
- Parálisis de la cuerda vocal (resultante de invasión de la n. recurrente del nervio vago), obstrucción de la vena cava superior o compresión de la tráquea o del esófago en tumores periféricos con evidente afectación mediastínica N2.
- Afectación de grandes vasos, definidos como aorta, vena cava superior, vena cava inferior, tronco de la arteria pulmonar, porción intrapericárdica de las arterias pulmonares derecha e izquierda y porción

intrapericárdica de las venas pulmonares derechas e izquierdas superiores e inferiores T4.

- Extensión directa al pericardio parietal T3.
- Extensión directa al pericardio visceral T4.
- Focos tumorales separados de la invasión pleural directa del tumor primario T4.
- Lesiones separadas por fuera de la pleura, en la pared torácica o en el diafragma M1.
- Tumor de Pancoast con afectación de cuerpo vertebral o extensión hacia los forámenes neuronales T4.
- Tumores simultáneos en el mismo pulmón: se utiliza la T más alta y se indica entre paréntesis la multiplicidad (m) o el número de tumores (nº) T (m) o T (nº).
- Carcinoma bronquioloalveolar en forma de infiltrado difuso sin evidencia de obstrucción endobronquial (Tx).
- Carcinoma bronquioloalveolar difuso bilateral M1.
- Carcinoma bronquioloalveolar en forma de varios nódulos en diferentes lóbulos, ipsi o contralaterales M1.

ESTADIOS TNM

ESTADIO OCULTO Tx N0 M0

ESTADIO 0 Tis N0 M0

ESTADIO I-A T1 N0 M0

ESTADIO I-B T2 N0 M0

ESTADIO II-A T1 N1 M0

ESTADIO II-B T2 N1 M0 / T3 N0 M0

ESTADIO III-A T1-3 N2 M0 / T3 N1 M0

ESTADIO III-B T4 N0-3 M0 / T1-3 N3 M0

ESTADIO IV T1-4 N0-3 M1

En un intento de mejorar la clasificación pronóstica, se ha dado a conocer recientemente la nueva propuesta TNM ISC-IASLC 2007 en la que el cambio más significativo se centra en el tamaño tumor (20). Para el apartado N se sugieren futuras investigaciones pero no hay información suficiente para modificar la clasificación existente hasta la fecha. En el apartado M se proponen un subgrupo M1a y M1b en función del pronóstico. En el momento actual 46 instituciones de 19 países trabajan de forma conjunta para compartir información de al menos 100.000 casos que servirán para la elaboración definitiva de la nueva clasificación TNM.

La exposición crónica a carcinógenos inicia un proceso caracterizado por anormalidades genéticas, cambios fenotípicos, y crecimiento excesivo de clones celulares en el pulmón (21).

El humo del tabaco, como principal factor de riesgo de cáncer de pulmón, se compone de una mezcla compleja que incluye sustancias responsables de aducciones de ADN, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas y nitrosaminas específicas del tabaco. Aproximadamente 1 de cada 10 fumadores desarrollaran un cáncer de pulmón dependiendo de la susceptibilidad a su desarrollo (22). El proceso llamado de carcinogénesis implica unas pocas décadas y resulta de la acumulación escalonada de múltiples anormalidades moleculares suponiendo la base para la transformación maligna y la progresión tumoral (23). La evidencia ha mostrado que tales anormalidades genéticas ocurren en etapas precoces en pulmones de fumadores crónicos y que ciertas anormalidades quizás persisten durante años a pesar incluso del abandono de fumar (24, 25). La mayoría de los cánceres de pulmón son diagnosticados entre exfumadores (26). Este hecho sugiere que la acumulación de daño molecular durante la exposición al humo de tabaco conlleva una cascada de eventos que conducen al diagnóstico del cáncer después de décadas de haber dejado de fumar. Existe un estudio que señala que cuanto más precoz es el inicio del tabaquismo se

tienen más posibilidades de daño en el ADN con respecto a los que se inician más tardíamente (27).

Se ha referido que el cáncer es básicamente una enfermedad del ciclo celular. El control de la proliferación celular puede alterarse en algunos de los puntos de chequeo o comprobación del ciclo celular provocando una división desmesurada. Las causas que pueden ocasionar esta alteración en las restricciones que limitan la división celular son en la mayoría de los casos adquiridas, de forma que en un momento de la vida una lesión genética importante con un fallo en los mecanismos de reparación, puede desencadenar un proceso neoplásico. El proceso de carcinogénesis implica, no obstante, varios eventos. Normalmente, existe un primer suceso, denominado iniciación, donde un agente externo o un error endógeno colocan a la célula en una situación de mayor susceptibilidad o predisposición para transformarse en neoplásica. En un segundo momento se produce la conversión en célula cancerosa de una célula previamente susceptible.

Los genes que codifican las proteínas implicadas en la regulación de la división celular parecen ser los responsables de la transformación neoplásica en sus primeras fases. Los agentes exógenos o errores endógenos, pueden inducir la expresión de genes cuyas proteínas, activan la entrada de la célula en división celular. Estos genes se llaman oncogenes promotores, porque desencadenan una proliferación descontrolada dando lugar a una neoplasia. Entre éstos destacan el myc, jun, fos, ras, etc. Asimismo, estos mismos factores exógenos o endógenos pueden, simultáneamente, bloquear la expresión o dañar otros genes cuyas proteínas tienen una función de inhibición de la proliferación, provocando ambos mecanismos, una pérdida de las restricciones de la división y un aumento de los

factores promitóticos. Este segundo grupo de genes con actividad de supervisión y control se denominan genes supresores por su papel regulador de la proliferación evitando el desarrollo de neoplasias. En este grupo el más importante es el gen p53 que actúa como "el guardián de la célula" .

La carcinogénesis conlleva a su vez una pérdida del reconocimiento de las células tumorales como anómalas, no evidenciándose una adecuada respuesta inmunitaria.

Los puntos de control responden al daño con parada del ciclo celular para que la célula disponga de tiempo para la reparación e induciendo la transcripción de genes que faciliten la reparación. La pérdida de puntos de control da como resultado inestabilidad.

Los puntos de control en el ciclo celular son:

- Al final de la fase G1 donde el llamado punto de control de restricción R, asegura que la célula, antes de entrar en la fase S, tenga un tamaño adecuado. Además, la célula detecta si las condiciones intracelulares y extracelulares son idóneas (tamaño celular, presencia de nutrientes y de factores de crecimiento) para comenzar la síntesis de DNA. Es el punto de control más importante.
- En la fase G2 existe un segundo punto llamado punto de control G2-M. En este punto se detecta si la replicación del DNA se ha completado correctamente y si el tamaño es el adecuado para la duplicación en dos células hijas.

- Finalmente, en la mitosis existe el punto de control M. Se localiza en la metafase y comprueba, antes de seguir adelante con la mitosis celular, que los cromosomas se han alineado correctamente sobre el huso mitótico.

En general los genes implicados en la carcinogénesis pulmonar se pueden dividir en dos grandes grupos. Los oncogenes llamados así por ser genes cuya función biológica conlleva la activación de vías que promueven el crecimiento y la división celular. Son genéticamente dominantes y es suficiente la variación de un alelo para el desarrollo de una alteración. La alteración de un oncogén por mutación puntual, amplificación o traslocación conlleva una sobreexpresión de la proteína codificante. Por otro lado los llamados genes supresores de tumores que regulan de forma negativa los procesos de crecimiento y división celular. Al contrario que los oncogenes, éstos son recesivos de tal modo que requiere de la alteración de los dos alelos para su disfunción. A tal disfunción se puede llegar por mutación alélica y la pérdida del otro (pérdida de heterocigosidad). Los tumores de pulmón pueden contener varios genes inactivados por deleciones cromosómicas y sin embargo sólo un pequeño número de estos genes supresores han sido identificados como verdaderas zonas diana.

Gen supresor	Cromosoma	Modo de inactivación	% tumor microcíticos	% tumor no microcítico
P53	17p13.1	PDH + mutación	80-100%	50-80%
RB	13Q14	PDH + mutación	80-90%	20-30%
P16	9P21	PDH + mutación, metilación	<10%	60%
SMAD2	18q21	PDH+ mutación	<10%	<10%
SMAD4	18q21	PDH + mutación	<10%	<10%
PTEN	10q23	PDH + mutación	10%	<10%
FHIT	3p14.2	PDH	75%	75%
PPP2R1B	11q23	PDH + mutación	Desconocido	Desconocido

TABLA 2. ZONAS DIANA DE GENES SUPRESORES DE TUMORES

ONCOGENES

RAS

La mutación de los protooncogenes Ras puede ser identificada frecuentemente en varios tipos de tumores incluyendo el de pulmón (28). K- Ras es la mutación más encontrada y representa aproximadamente el 90% de las mutaciones Ras identificadas. En el cáncer de pulmón se encuentra en un 20% de los tumores con mutación del codón 12,13 y 61. La mutación H Ras y N Ras son menos habituales suponiendo un 1 % de los cánceres de pulmón. Casi un 70% de las mutaciones Ras son transversiones G a T en el codón 12. Entre los subtipos de tumores pulmonares existen diferentes mutaciones. La mayoría de las mutaciones K-Ras se detectan en adenocarcinomas (30% de estos tumores) sugiriendo que esta mutación es importante en el desarrollo de un adenocarcinoma (29, 30). Desde que se localizó esta mutación en estadios tempranos de enfermedad, se ha planteado su papel en la iniciación tumoral y progreso a tumor (30, 31).

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

El receptor del EGF (EGFR) junto con HER-2/ neu, c-erbB3 y cerbB4 son miembros de la familia EGF tipo I. El EGF y el factor de crecimiento alfa (TGF- alfa) son ligandos de EGFR. La sobreexpresión de EGF y TGF alfa ha sido encontrada en un 60% de los tumores no microcíticos (32). Aproximadamente el 70% de los tumores epidermoides y el 40% de los adenocarcinomas sobreexpresan EGFR (33). Estos datos sugieren que la interrupción de la cascada de señales de la vía EGF, juega un importante papel en el tumor no microcítico de pulmón.

HER-2/NEU

En el cáncer de pulmón la sobreexpresión de HER-2/neu se ha encontrado en un 4,3 a 37% (34).

FACTORES NEUROENDOCRINOS

La expresión de factores neuroendocrinos incluyendo péptido gastrina bombesina (GRP/BN) y sus receptores ha sido informada en cánceres de pulmón. GRP/BN está asociado con un espectro de efectos fisiológicos, incluyendo la regulación de la secreción, crecimiento y neuromodulación. Al menos 3 receptores de GRP/BN han sido identificados. Solo la mitad de los tumores microcíticos expresan GRP (35). La expresión de este gen se activa precozmente en mujeres fumadoras y quizás actúe como un factor en el incremento de susceptibilidad de la mujer al cáncer de pulmón inducido por tabaco (36).

MYC

La familia MYC (c-myc, n-myc, l-myc) codifica fosfoproteínas involucradas en la regulación de la transcripción de otros genes responsables de la proliferación celular. En contraste a los oncogenes Ras, los cuales están activados por mutaciones puntuales, las mutaciones de los oncogenes myc son raras en los cánceres de pulmón. Pero si hablamos de amplificación, éste es más frecuente. Se ha descrito que la amplificación de los oncogenes myc puede ser importante para evaluar el papel de la quimioresistencia de los tumores de pulmón. Se ha observado amplificación en tumores recurrentes después de la quimioterapia (37).

CICLINA D1/KINASA 4 CICLÍN DEPENDIENTE (CDK4)

La ciclina D1 juega un importante papel en la regulación del ciclo celular. Su sobreexpresión se encuentra de forma mayoritaria en líneas celulares de tumores no microcíticos y es principalmente ocasionada por amplificación anormal del gen. En tumores no microcíticos, un 12-40% de los tumores sobreexpresan ciclina D1 pero solo en una pequeña proporción de ellos, juega algún papel trascendente sospechando que tiene que haber otros mecanismos implicados en la sobreexpresión de las proteínas (38). En cuanto a la quinasa CDK4 se ha encontrado anormalmente sobreexpresada en los tumores no microcíticos, sugiriendo que juega algún papel en la tumorigénesis pulmonar (39).

CDC 25

CDKs (Quinasas dependientes de ciclina) pueden ser activadas por CDC 25, el cual anula los fosfatos inhibidores procedentes de residuos de la tirosina y treonina .Al menos 3 genes CDC 25 han sido identificados en humanos (CDC 25A , el CDC 25B y CDC 25C).Wu et al (40) encontraron sobreexpresión del CDC 25A en un 60% de los tumores no microcíticos, 45% del CDC 25B y 0% en CDC 25C , notificado que la sobreexpresión del CDC25A y CDC25B está asociado a pobre diferenciación histológica del tumor.

CICLINA B1

Es una molécula clave para la fase de transición G2- M durante el ciclo celular. Soria et al (41) analizaron la expresión de ciclina B1 en tumores no microcíticos

en estadio precoz, describiendo que un 22% de los tumores expresaban ciclina B1 en niveles altos. Los pacientes que sobreexpresan ciclina B1 tienen una supervivencia menor respecto a pacientes que expresan niveles bajos de ciclina B1. De forma interesante la sobreexpresión de ciclina B1 es más frecuente en tumores escamosos que en otros subtipos histológicos. Así mismo puede ser un factor adverso para pronóstico sólo en pacientes con tipo histológico escamoso. Estos datos indican que en el subtipo escamoso, la ciclina B1 puede estar disregulada y que niveles altos sean marcador pronóstico en estadios tempranos de enfermedad.

CICLINA E.

La sobreexpresión de la ciclina E ha sido informada al menos en el 50% de los tumores no microcíticos de pulmón y de forma predominante en el tipo histológico escamoso (42).

GENES SUPRESORES DE TUMORES

P53

Es el prototipo de gen supresor de tumores que más comúnmente está alterado en el cáncer humano. Está situado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p). Codifica una proteína nuclear, la cual está implicada en el control del ciclo celular, reparación del ADN, diferenciación celular, estabilidad genómica y muerte celular programada (43, 44) (Figura 3). Las mutaciones del gen supresor de tumores p53 juegan un importante papel en la tumorigénesis pulmonar. P53 se inactiva por daño en ambos alelos a menudo por pérdida alélica y mutación puntual. Las mutaciones de p53 en el cáncer de pulmón están correlacionadas con tabaquismo (45) y son los carcinógenos del tabaco los responsables de transversiones de guanina-timina (G-T). Ocurren en aproximadamente un 50% de los no microcíticos y en más del 70% de los microcíticos (46, 47). Frecuentes acumulaciones de proteína p53 han sido notificadas en lesiones preneoplásicas de epitelio bronquial, tales como metaplasia, displasia y carcinoma in situ (48, 49).

P16 *INK4*.

Se trata de un inhibidor de la CDK4/ciclina D y juega un importante papel en el control de la fase G1 a S. La inactivación de p16 en los tumores no microcíticos es principalmente causada por mutaciones, deleciones o hipermetilación promotora del gen (50). La hipermetilación de p16 es comúnmente el principal mecanismo de inactivación, pudiendo ser detectada en epitelio bronquial de fumadores (51) con

alto riesgo, sugiriendo que la inactivación ocurre en estadios precoces de la tumorigénesis (52, 53). Permanece inactivado en cerca del 40% de los NSCLC (54).

FHIT

El descubrimiento del gen FHIT (Fragile Histidine Triad) localizado en la región cromosómica 3p14.2, ha traído una gran atención desde que se observó que va acompañado de una región cromosómica frágil comúnmente conocido como FRA3B. Estas zonas muestran cierto número de características de inestabilidad puesto que son lugares donde ocurren preferentemente deleciones cromosómicas. En los cánceres de pulmón la anormal transcripción de FHIT puede ser hallada en un 40% de los no microcíticos y un 80% de los microcíticos (55). La pérdida de la expresión de la proteína FHIT fue hallada en aproximadamente el 50% de los tumores primarios no microcíticos incluyendo estadios precoces y asociados con el consumo de tabaco (54). La pérdida de la expresión FHIT fue además encontrada en algunas lesiones premalignas sugiriendo que tal anomalía podía ocurrir de forma precoz (56).

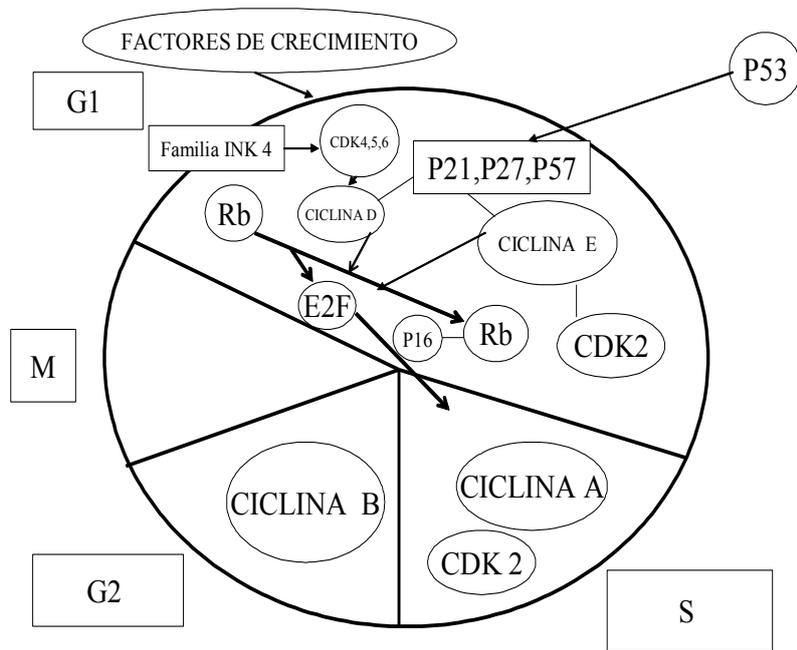


ILUSTRACIÓN 2 REGULADORES DEL CICLO CELULAR IMPLICADOS EN EL CÁNCER DE PULMÓN.
 ADAPTADO DE HUNTER, T ET AL.1994. CYCLINS AND CANCER II: CYCLIN D AND CDK INHIBITORS
 COME OF AGE.CELL 79:573-582.

APC

El cromosoma 5q contiene al menos 2 regiones independientes en las que se han descrito PDH (pérdida de heterocigosidad) . Son la 5q33-35 y 5q21. La región 5q21 contiene a su vez 2 genes supresores de tumores (APC y MCC). El gen APC (Adenomatous Polyposis Coli) juega un importante papel en el punto de control de G1 a S. Pérdidas alélicas en 5q21 han sido demostradas en laringe, esófago y estómago (57-59). Ueno et al (60) han observado una incidencia de un 55% en estadios avanzados de carcinoma broncogénico no microcítico. Similarmente Fong et al (61) han descrito una alta frecuencia de PDH en estadios avanzados de carcinoma broncogénico (34%) comparado con estadios precoces (26%) y además encuentran una mayor incidencia en carcinoma de estirpe escamoso (37%) que en adenocarcinomas (14%).

Sanz Ortega et al (62) en un estudio sobre las PDH en células bronquiales, aparentemente sanas, adyacentes a cáncer no microcítico de pulmón, describe una alta incidencia de PDH en células tumorales a nivel de cromosoma 5q21 (72% de los casos informativos), 9p21 (48%), y p53 (33%). El análisis de células peritumorales mostraba que la PDH estaba todavía presente en células histológicamente sanas adyacentes al tumor en un número significativo de casos 37.5% (5q21), 27% (9p21%) y 13% en 17p13. Estos datos apoyan la idea de que la PDH en 5q21 en un evento precoz en la carcinogénesis de tumores no microcíticos.

En pacientes sin evidencia de malignidad tales cambios son inusuales por lo que el estudio de PDH puede complementar al estudio histológico en la evaluación de células bronquiales adyacentes a tumores. Las PDH, al estar presentes antes que los cambios histológicos, podrían ser útiles para seleccionar grupos de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (63).

PRINCIPALES ANORMALIDADES MOLECULARES EN EL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y GENÉTICAS. INESTABILIDAD DEL GENOMA

La inestabilidad del genoma es un fenómeno universalmente encontrado en los cánceres (64). Es una característica fundamental de la iniciación y progresión tumoral. Sin embargo, son poco conocidos los mecanismos necesarios para llegar a la inestabilidad.

La inestabilidad es un fenómeno al que parece que se llega, a través de diferentes vías. En una pequeña proporción de tumores pulmonares priman las deficiencias en el mecanismo de reparación por inestabilidad microsatélite, En otros tumores el anormal número de cromosomas (aneuploidia) es el hecho dominante.

Por tanto en las células neoplásicas se conocen 2 formas distintas de inestabilidad genética. La inestabilidad del cromosoma que conduce a aneuploidia y la inestabilidad microsatélite que conduce a frecuentes errores durante la replicación de nucleótidos, es decir, que el número de bases repetidas en la nueva rama de ADN es diferente de la original, resultando la aparición de bucles pequeños en una

de las 2 bandas. La inestabilidad microsatélite conduce a mutaciones o silenciamiento de los genes reparadores del ADN (MLH1, MLH2, PMSL1, PMSL2 y MSH6). Los mecanismos de reparación del ADN contribuyen a la estabilidad del cromosoma pero una disfunción de los mismos puede favorecer la carcinogénesis (65-67). Actualmente está poco clara la importancia del papel que juegan los defectos específicos en genes reparadores de ADN en la carcinogénesis.

Se entiende como microsatélite a una secuencia repetida de 1 a 6 pb constituyendo una fracción del ADN no codificante. Son relativamente raros en regiones que codifican proteínas (68, 69). La distribución de estos microsatélites no es aleatoria. Se caracterizan por tener niveles altos de polimorfismo. Con el uso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) el microsatélite se convirtió en un versátil marcador genético. El microsatélite ha probado ser extremadamente útil para mapear el genoma de muchos organismos, y actualmente puede ser usado como herramienta en cribado genético en estudios de epidemiología molecular (70). La inestabilidad microsatélite fue descrita por primera vez en el síndrome de Lynch (cáncer colorectal hereditario no polipoideo) (71). Este fenómeno también se ha explicado en otras patologías como cáncer de pulmón (72), sarcoidosis (73), EPOC (74) y asma (75). Se ha sugerido que la inestabilidad microsatélite causa mutaciones a nivel nucleotídico como mutaciones puntuales y de este modo facilitar la inactivación de genes supresores de tumores como p53 resultando en una disregulación del ciclo apoptótico celular (76).

La inestabilidad cromosómica puede conducir a alteración de la estructura o del número de cromosomas. Es frecuente encontrar en células tumorales, deleciones y amplificaciones cromosómicas (77). En cuanto a otras modalidades de cambios

cromosómicos como son las translocaciones, son menos frecuentes en el cáncer de pulmón (78). Las translocaciones cromosómicas modifican la función del gen a través de la disregulación de la expresión celular de los protooncogenes, sin alterar la estructura del producto proteico.

Aunque se han podido detectar, con nuevas tecnologías, diversas deleciones en regiones cromosómicas como 1p, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 13q, 17p, 18p, 19q, 21q y 22q , las alteraciones más comunes implicadas son las pérdidas de regiones cromosómicas también conocidas como pérdidas de heterocigosidad (PDH) en regiones microsatélite de 3p21 y 9p21, deleciones del brazo cromosómico 5q21 , mutaciones de p53 asociadas con PDH en 17p y mutaciones puntuales de K- ras (31). Las pérdidas de regiones cromosómicas en 3p y 9p han sido reconocidas como eventos precoces (79) e incluso identificadas en lesiones preinvasivas y tejido epitelial bronquial aparentemente sano de fumadores (23, 24). En el caso de estos últimos, los cambios cromosómicos quizás desaparecen después de dejar de fumar y son reemplazados por células sin daño, pero hasta la fecha la dinámica de este proceso es todavía una incógnita. Así mismo la PDH en región cromosómica 8p es uno de los cambios más precoces que se desarrollan en el cáncer de pulmón (80).

Tseng et al (81) refleja, en su estudio, que existen 3 marcadores microsatélite en los cuales la presencia de pérdida de heterocigosidad está significativamente asociado a peor pronóstico de enfermedad: D2S2968, D6S2439 y D7S1818. Estos autores señalan que existen unos determinados loci cromosómicos en los que parece que predominan las PDH y serían 1p34.1, 3p14.3, 3p22.2, 3p25.1, 4p15.2, 4q34.1, 5q14.3, 5q35.1, 9q21.32, 12q14.3, 17p13.1, y 17p13.2 ya estudiadas por

otros autores. Pero además describen otras 8 nuevas zonas con alto porcentaje de PDH y que serían: 2p23.3, 2p24.3, 2q35, 6p22.2, 7p14.3, 7p22.2, 17q24.3, y 21q22.3. Se señala la importancia del cromosoma 3 donde se ubica la zona 3p14.1 identificada como marcador de estadio precoz (D3S1285). El marcador D1S1612 es especialmente interesante por estar asociado a tabaquismo y cáncer en estado avanzado y el D1S3721 que está asociado a mal pronóstico, aparece en el 67% de los estadios III y sugiere asociación con metástasis de tumores no microcíticos.

MODIFICACIÓN EPIGENÉTICA DEL ADN POR HIPERMETILACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS

La metilación del ADN juega un importante papel en la regulación de la expresión genética. El status de metilación cambia significativamente en los cánceres y se piensa que contribuye a la tumorigénesis (82). La hipermetilación ha sido descrita como un escalón precoz de progresión tumoral por causar pérdida de control del ciclo celular, pérdida de los mecanismos de reparación y pérdida de la interacción celular (e- cadherinas). El mecanismo exacto por el cual la hipermetilación causa progresión tumoral es todavía desconocida, pero ha sido propuesto como un excelente marcador tumoral (83). Los tumores exhiben normalmente una global hipometilación e hipermetilación de regiones promotoras que se asocian con silencio de expresión genómica. El descubrimiento de numerosas regiones hipermetiladas en genes supresoras de ADN, a falta de un mejor entendimiento de los mecanismos de silenciación génica, indica que es un mecanismo alternativo de inactivación de genes supresores (84) tales como p16, GSTP1, MGMT, TIMP y Kinasa DAP.

ACTIVIDAD TELOMERASA

Los telómeros localizados en los extremos de los cromosomas son importantes mantenedores de la estabilidad de los cromosomas. Las células madre germinales tienen actividad telomerasa en orden a compensar el acortamiento de la cadena de ADN sufrido durante la replicación (85) cuando la mayoría de las células normales del adulto no exhiben actividad telomerasa. La actividad telomerasa es detectable en la mayoría de los cánceres (86) microcíticos y en el 80-85% de los no microcíticos (87), indicando que la reactivación telomerasa es importante en la tumorigénesis pulmonar y causa de inmortalidad celular. Una alta actividad telomerasa ha sido asociada con un incremento de proliferación celular y estadio avanzado de enfermedad (88). La actividad telomerasa puede ser detectada incluso en lesiones precancerosas pulmonares reflejando a sí mismo una implicación precoz en la tumorigénesis (89).

POTENCIALES BIOMARCADORES EN EL CRIBADO DE CARCINOMA BRONCOGÉNICO

PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD (PDH) EN GENES SUPRESORES DE TUMORES

Varios estudios señalan que la inactivación de genes supresores de tumores por pérdida de heterocigosidad (PDH) ocurre precozmente en la patogénesis del cáncer de pulmón (24, 90, 91).

Las PDH no desaparecen con el cese del hábito tabáquico, hecho que nos plantea su posible utilidad como biomarcador.

METILACIÓN ABERRANTE

Varios genes supresores de tumores son silenciados por hipermetilación de la región promotora así como por pérdida o mutación. Entre estos genes están: p16, 06-MGMT, RassF1, RAR β , FHIT y H-cadherina.

EXPRESIÓN TELOMERASA

Shay et al (92) afirma que la telomerasa es un potencial biomarcador porque puede ser detectado en la mayoría de los cánceres y es infrecuentemente expresado en tejidos normales. Más del 50% de los tumores no microcíticos y casi el 100% de los microcíticos expresan telomerasa. No está claro sin embargo si la expresión telomerasa en esputo, sangre o biopsia bronquial es útil para cribado en diagnóstico precoz.

MATRICES DE EXPRESIÓN GENÉTICA

Se trata de una novedosa tecnología capaz de evaluar la expresión de miles de genes simultáneamente y determinar el perfil de expresión.

A través de los estudios de 3 grupos de trabajo (93-95) se muestra que hay varias subclases de adenocarcinomas que tienen diferentes pronósticos. Por ejemplo, los adenocarcinomas que expresan el gen neuroendocrino tienen tendencia a tener peor pronóstico. Los adenocarcinomas que expresan enzimas implicadas en el metabolismo eicosanoide se asocian también a peor pronóstico. Al menos 900 genes son diferentemente expresados entre los tumores pulmonares y tejidos normales siendo al menos 44 de ellos consistentemente sobreexpresados con respecto a tejidos normales pulmonares. Las proteínas codificadas por muchos de estos genes son bien conocidas e incluso llegan a producir anticuerpos contra estas proteínas. El encontrar estas proteínas producidas por genes sobreexpresados, podría proporcionar un excelente método para detección precoz de cánceres de pulmón a través del estudio en muestras de sangre o esputo. Hofmann et al (96) publicaron un estudio en el cual, empleando tecnología genechip de affymetrix, determinaron el perfil de expresión génico de muestras de tejido pulmonar neoplásico comparado con sano. Los procesos celulares que se ven más influidos por los genes sobreexpresados son la regulación del ciclo celular, la adhesión celular y el metabolismo de los nucleótidos. La expresión de determinados genes específicos reveló una diferenciación fiable del tejido tumoral del normal así como la clasificación de ambos subtipos de carcinoma no microcítico (escamoso y adenocarcinoma).

<u>Adenocarcinomas</u>	<u>Epidermoides</u>
Factor 1 transcriptor tiroideo	Citoqueratina 6 ^a
Factor transcriptor específico DAT1	Proteína tumoral 63 KDa
Paraoxonasa 3	Queratina 16
Claudina 3	Desmocolina 3
Factor 3 transcriptor hepático	Proteína A2 S 100
Citocromo P450 2 B7	Citoqueratina 15
Ocludina	Citoqueratina 17
Factor transcriptor específico DAT1	Colágeno COL 17 A1
	Colágeno COL 7 A1
	Integrina alfa 6

TABLA 3. PERFIL DE EXPRESIÓN MOLECULAR EN ADENOCARCINOMAS Y EPIDERMÓIDES.

En este contexto, colagenasas (COL7, 17) y citoqueratinas (CK6, 15, 17) están preferentemente inducidas en el carcinoma epidermoide mientras que varios factores de transcripción (TTF1, DAT1, TF-2) están exclusivamente elevados en el adenocarcinoma. Después de identificar los genes que se sobreexpresan en tumores no microcíticos, éstos se clasifican de acuerdo a una clasificación gerontológica que consiste en una triple estructura que describe productos génicos en términos de los procesos biológicos a los que están asociados, componentes

celulares y funciones moleculares. Entre los genes con sobreexpresión se determinaron la ciclina B1, ciclina B2 y topoisomerasa II alfa, las cuales están implicadas en la regulación del ciclo celular. Los productos genéticos codificantes asociados a los procesos de adhesión celular están además sobreexpresados de forma frecuente, tales como colágenos (COL1A1, COL3A1, COL7A1, COL17A1), desmocollinas (2 y 3) y claudina. Además estos autores revelan los genes sobreexpresados que están implicados en los procesos catalíticos de la matriz extracelular incluyendo metaloproteasas (MMPs 1, 9 y 12.)

La determinación de la expresión génica basado en tecnología de DNA micromatrices proporciona ayuda para identificar nuevas dianas y vías de malignidad, ofrece la oportunidad de establecer clasificaciones tumorales y quizás un sistema de estadificación molecular a partir de los genes que se expresan. El objetivo del estudio de estos autores era evaluar los diferentes genes expresados como potenciales dianas de ADN arrays específicos para cáncer de pulmón, para nuevos diagnósticos y conceptos terapéuticos. Estos autores examinaron 59.620 genes y sólo 344 (0.6%) se expresaban de forma significativa en el tejido pulmonar neoplásico, lo cual podría ser una indicación de que sólo unos pocos genes cambian su expresión durante el proceso de la tumorigénesis y metástasis. Además de ver qué genes se expresan de forma diferente, también es esencial estudiar la función que desempeñan el ó los productos de estos genes. En este estudio los genes que están altamente expresados en el tejido tumoral están implicados en el proceso de crecimiento celular, en el proceso de comunicación celular y en el de adhesión. La activación prolongada o mantenida de la proliferación celular representa uno de los hechos más decisivos del desarrollo tumoral. Por consiguiente los genes involucrados en la regulación del ciclo celular

muestran una alta expresión en casi todos los análisis de micromatrices de ADN estudiados en carcinomas broncogénicos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La detección en mucosa oral de pérdidas de heterocigosidad, en alguna de las posiciones cromosómicas (locus) 17p13, 9p21 y 5q21, es un método útil como factor pronóstico de carcinoma broncogénico.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

Estudiar la utilidad de la detección de pérdidas de heterocigosidad (PDH) en los locus cromosómicos 17p13, 9p21 y 5q21, sobre muestras de material citológico exfoliado de cavidad oral, como factor pronóstico de carcinoma broncogénico.

Objetivos secundarios:

1. Estudiar la presencia de PDH en los locus 17p13, 9p21 y 5q21 en muestras de material citológico de cavidad oral en las tres poblaciones de estudio (grupo tumoral, grupo de riesgo fumador y grupo control no fumador).
2. Estudiar si la presencia de estas alteraciones se relacionan con exposición al humo de tabaco.

3. Estudiar la utilidad de material citológico exfoliado de la cavidad oral, como muestra para la realización de estudios de cribado poblacional en carcinoma broncogénico.
4. Definir las características del grupo de riesgo para aplicación de futuros programas de detección precoz en carcinoma broncogénico.

METODOLOGÍA

DISEÑO

Estudio descriptivo transversal.

POBLACIÓN DIANA

El estudio incluye un total de 200 personas seleccionadas en el Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla” de Madrid, divididas en tres grupos con las siguientes características:

Grupo 1: Grupo control presuntamente sano, no fumador. Criterios de inclusión:

1. Personas asintomáticas con normalidad de exploraciones complementarias (*).
2. No fumadoras
3. De ambos sexos

4. Edad > 45 años
5. No tumores malignos previos
6. Consentimiento informado aceptado

Grupo 2: Grupo de riesgo fumador presuntamente sano. Criterios de inclusión:

1. Personas asintomáticas con normalidad de exploraciones complementarias (*).
2. Exfumador o fumadoras de más de 20 paquetes /año.
3. De ambos sexos
4. Edad > 45 años
5. No tumores malignos previos
6. Consentimiento informado aceptado.

Grupo 3: Grupo tumoral. Criterios de inclusión:

1. Personas con diagnóstico histológico de cáncer broncogénico y estadificación TNM.
2. De ambos sexos
3. Edad > 45 años
4. No antecedentes tumorales.
5. No haber sido sometido a tratamiento oncológico, radioterapéutico o quirúrgico.

6. Consentimiento informado aceptado.

(*). A todos los participantes se realiza, al menos, en el caso de entrar en estudio, una historia clínica y exploraciones complementarias (Hemograma, bioquímica, rx de tórax).

Criterios de exclusión:

1. Por deseo del paciente.
2. Presentar alteraciones psiquiátricas que impidan la toma de decisiones.
3. Haber padecido cáncer de otra localización.
4. No cumplir con los criterios de inclusión.

TIPO DE MUESTREO

Consecutivo no probabilístico

TAMAÑO MUESTRAL

Al no haberse encontrado estudios similares se establece un tamaño muestral de $n = 200$ distribuido en tres grupos: Grupo tumoral $n = 47$, grupo de riesgo $n = 114$ y grupo control $n = 39$.

VARIABLES

- Variables independientes:
 - Grupo de estudio (politémica de 3 categorías): no fumador sin carcinoma broncogénico, fumador o exfumador sin cáncer broncogénico y fumador o exfumador con cáncer broncogénico.
 - Estadios TNM (politémica).
- Variables dependientes:
 - Pérdida de heterocigosidad en APC (dicotómica)
 - Pérdida de heterocigosidad en p16 (dicotómica)
 - Pérdida de heterocigosidad en p53 (dicotómica)
- Variables control.
 - Edad: cuantitativa discreta (años cumplidos)
 - sexo (dicotómica)
 - hábito tabáquico (dicotómica: fumador/no fumador)
 - consumo de cigarrillos (cuantitativa discreta: paquetes/año)

- años de tabaquismo (cuantitativa discreta)

- estirpe histológica tumoral (politómica)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como índice de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas se utilizarán la media aritmética y la desviación estándar, o la mediana y el rango intercuartílico, en función de asumirse, o no, respectivamente, el supuesto de la normalidad de las distribuciones verificado con el test de Kolmogorov-Smirnov.

Las variables cualitativas se presentarán con sus frecuencias absolutas y relativas en tantos por ciento (%).

Para determinar la asociación entre 2 variables categóricas se empleará el test χ^2 de Pearson. En el caso de ser ambas dicotómicas se utilizará la prueba exacta de Fisher y la valoración del efecto se realizará mediante la estimación de las razones de prevalencia (RP) y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95% de dichas RP.

La asociación entre una variable independiente dicotómica y dependiente cuantitativa se valoró con el test t de Student para muestras independientes o el de Mann-Whitney, en función de asumirse, o no, respectivamente, el supuesto de la normalidad de ambas distribuciones de la variable cuantitativa.

Se realizará un análisis de regresión logística para determinar el efecto que tienen las variables independientes seleccionadas por su significación estadística, en el análisis bivariado frente a la presencia, o no, del cáncer broncogénico. Serán

candidatas a ser incluidas en el modelo aquellas variables, cuantitativas y categóricas, que en el análisis bivariado hayan obtenido un valor de $p < 0,250$.

El grado de concordancia entre las muestras tumorales y las de saliva se establece a través del cálculo del coeficiente kappa de Cohen.

Se considera como significación estadística un valor de $p < 0,05$.

Para todo ello se empleará el paquete estadístico SPSS® versión 15 (SPSS® inc. Chicago, IL, USA).

MÉTODOS CLASIFICATORIOS DE CARCINOMA BRONCOGÉNICO

Para el grupo tumoral se aplica la clasificación TNM 1997 de acuerdo con las organizaciones internacionales (Unión Internacional contra el Cáncer; UICC-SEPAR - AJCC).

SELECCIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES

La selección de los tres genes supresores de tumores (p53, p16 y APC) se realizó en base a una exhaustiva revisión de la literatura y a criterios de disponibilidad del material preciso para dicho estudio. Las pérdidas de heterocigosidad de genes supresores de tumores se señalan tras varios estudios, como eventos precoces de la carcinogénesis pulmonar relacionados con el consumo de tabaco.

MATERIAL FÍSICO

Los estudios de patología molecular han sido desarrollados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central de la Defensa y el Servicio de Anatomía Patológica (Sección de Biología Molecular) del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid.

RECLUTAMIENTO

Reclutamiento de personas con los criterios de selección citados previamente y clasificados en tres grupos que hemos llamado grupo tumoral, grupo de riesgo y grupo control. Tras ser informados del estudio se les solicita consentimiento informado firmado para la participación en el estudio y poder ser sometidos a los estudios pertinentes.

Se cuenta igualmente con la autorización de la Comisión de Investigación del Hospital Central de la Defensa tras comprobar que el proyecto se ajusta a la metodología científica, correcta y suficiente base de conocimiento, viabilidad y adecuación a la legislación vigente (Normativa de Helsinki).

TOMA DE MUESTRAS

Mucosa oral: Se procede con un hisopo a obtener un raspado de la mucosa de la cavidad oral, se introduce en un tubo Ependorf. Añadimos 200 ul de agua destilada y centrifugamos durante 10 min a 15000 rpm, para que todas las células queden depositadas en el fondo del tubo.

Sangre: Se recoge en un tubo con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se congela a -20°C. La finalidad de utilizar este tipo de muestra, es la obtención del ADN de células linfocitarias como control positivo, y poder así determinar, con mayor seguridad, las posibles pérdidas de heterocigosidad (PDH) que un individuo pudiera tener en las células superficiales de la mucosa oral.

EXTRACCIÓN DEL ADN

Se realiza siguiendo el protocolo de extracción del KIT comercial High Pure PCR Template Preparation de Roche.

La extracción consiste en lisar las células para obtener el DNA. Esto supone tener que romper las membranas celular y nuclear para liberar al medio el ADN, ya libre de histonas. Las histonas son las proteínas que “envuelven” al DNA. Para ello preparamos una disolución que lise las células, rompiendo las membranas y degradando todas aquellas proteínas que puedan afectarnos posteriormente. Este buffer de lisis ya esta optimizado en el KIT para obtener un rendimiento muy alto en un corto periodo de tiempo. La mezcla (muestra de sangre o mucosa con el buffer de lisis y proteinasa K) se deja incubar preferiblemente en baño durante 10 minutos dado que aporta una temperatura más homogénea que la estufa.

Una vez transcurrido este tiempo, se saca del baño y se desactiva la proteinasa K con calor a 94 °C durante 10 minutos y se enfría a 4 °C. Cuando a las proteínas se las somete a temperaturas elevadas, generalmente superiores a 90 °C, éstas se desnaturalizan, es decir, pierden su conformación, su estructura tridimensional que hace que sean funcionales. Las proteínas tienen varios niveles de plegamiento, estructura primaria (secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos), estructuras secundarias y la terciaria donde existe un plegamiento 3D formándose enlaces entre aminoácidos no contiguos. Cuando se eleva la temperatura, estos enlaces intermoleculares se rompen, la proteína se despliega pero nunca se llegan a romper los enlaces peptídicos. Al enfriar bruscamente y de forma rápida, la proteína tiende a plegarse de nuevo, pero lo hace de forma incorrecta, por lo que sigue siendo inactiva.

Es muy importante conseguir la desactivación de la proteinasa dado que en caso contrario, degradaría la polimerasa durante el proceso de PCR y no tendría lugar la amplificación del ADN.

Los siguientes pasos del KIT consisten en realizar diferentes lavados para purificar el ADN. Los diferentes lavados se harán empleando tubos con filtro y centrifugando. En el filtro quedará el ADN que se irá lavando para eliminar todas las impurezas. Los diferentes lavados hacen que las sustancias se disuelvan en los buffers de modo que al centrifugar queda el ADN en el filtro y las impurezas en el sobrenadante.

El primer lavado se realiza con un buffer de inhibición de proteinasa K que consta de guanidina- HCl 5M y 20 mM de Tris-HCl a pH 6.6. Inhibe la proteinasa K de

forma química, la hace soluble y se elimina por filtración al someterlo a una centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante.

El siguiente lavado se realiza con un buffer de lavado 20 mM de NaCl, Tris-HCl 2 mM pH 7.5. Se centrifuga, se descarta el sobrenadante y se repite el proceso.

El último paso es la elución ó extracción de ADN. Se añade el buffer de elución 10 mM Tris pH 8.5 previamente calentado a 70 C. Se centrifuga y se recoge el sobrenadante donde está disuelto el ADN.

Esquema del procedimiento de extracción del ADN.

- 100µl de muestra de estudio + 100µl de Buffer de lisis + 20µl de proteinasa K.
- Incubar 10 min a 72°C
- Desactivar proteína K 10 min a 94°C
- Centrifugar 1 min a 8.000 rpm
- Añadir 50 µl de Isopropanol, mezclar y pasar a tubo con filtro
- Centrifugar 1 min a 8.000 rpm
- Añadir 250 µl de buffer de inhibición.
- Centrifugar 1 min a 8.000 rpm
- Descartar sobrenadante
- Añadir 250 µl de buffer de lavado

- Centrifugar 1 min a 8.000 rpm
- Descartar sobrenadante
- Añadir 250 µl de buffer de lavado
- Centrifugar 10 seg a 8.000 rpm
- Descartar sobrenadante
- Introducir tubo con filtro en tubo Eppendorf
- Añadir 100µl de buffer de elución (70°C)
- Centrifugar 1 min a 8.000rpm
- Recoger sobrenadante y se obtiene ADN purificado.

AMPLIFICACIÓN.REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR es la técnica de amplificación de fragmentos de ADN utilizando una polimerasa de un microorganismo termoestable, que replica el ADN de forma rápida y a temperaturas elevadas. Es una técnica sensible pues necesita muy poca cantidad de ADN (1 pg se puede ampliar 1 millón de veces), es selectiva porque a partir de ADN genómico se puede ampliar selectivamente el fragmento de ADN que queramos y es un proceso rápido porque se realiza en pocas horas.

Esta técnica consta de tres etapas: *Desnaturalización, hibridación y extensión.*

Las condiciones de amplificación vienen prefijadas por la casa comercial de los *primers*.

MARCAJE DE LOS PRIMERS

Para los estudios de microsatélites se usarán marcadores polimorfos de regiones microsatélite de los cromosomas 9p21 (D9S171), 17p13 (D17S799) y gen APC 5q21 (D5S346) que han demostrado una alta asociación con el cáncer de pulmón. Se emplearán oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con fluorescencia, que previamente han sido diseñados y fabricados por Applied Biosystems.

Los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

- D17S799 VIC (para p53)
- D9S171 NED (para p16)
- D5S346 F: 6 Fam ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG (G1712909527) (para APC)
- D5S346 R: AGC AGA TAA GAC AAG TAT TAC TAG TT (para APC)

Sobre las regiones D9S171 y D17S799 se realizará una PCR múltiple y sobre la región D5S346 PCR simple.

Las reacciones se llevarán a cabo en un termociclador modelo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación serán: Para PCR múltiple 95° 10 min., (95° 40 seg., 56° 40 seg., 72° 40 seg.), 34 ciclos. 72° 10

min. y 4º infinito. Para PCR simple 95º 5 min., (95º 30 seg., 56º 30 seg., 72º 30 seg.), 34 ciclos, 72º 10 min. y 4º infinito.

El oligonucleótido 5' va marcado con fluorescencia para su análisis con el software de Gene Mapper del Analizador Genético Abi Prism 3130 de Applied Biosystem.

Las muestras son analizadas por fluorescencia en el Analizador Genético Abi Prism 3130 Genetic Analyser de Applied Biosystems, empleando el método de análisis de fragmentos.

La preparación de las muestras previa al análisis es la siguiente:

- En una placa de reacción óptica (ref: 96-well optical Reaction Plate) introducimos 2.5 ul del producto amplificado de PCR.
- Añadir 20 ul de formamida.
- 5 ul de LIZ marcador de peso molecular (Genescan 500 HD size Standard. Applied Biosystem (AB).
- Desnaturalizar en el termociclador 10 min. a 94 ºC.
- Eliminación de todas las burbujas de aire en las muestras mediante un golpe de centrifuga.
- Montaje de la placa para su análisis, y programación del analizador genético. Técnica utilizada: Electroforesis capilar, utilizando el polímero POP 4 TM en un Capillary array de 4 x 36 cm.

El programa de análisis es el GeneMapperID v 3.2 de A.B.

Lectura de los datos: número de pares de bases y área del pico de fluorescencia mayor. A partir de esta lectura se clasifican los casos en:

I. Casos no informativos:

- Homocigotos: Pueden presentar pérdida de heterocigosidad pero no se puede calcular. El número de pares de bases del fragmento amplificado es el mismo en cada alelo. Las señales de fluorescencia de cada alelo se solapan, por lo que sólo se ve una señal, de mayor intensidad correspondiente a la suma de ambas.
- Diferencia en un par de bases. En este caso, existe una interferencia de señal, lo que se conoce como artefacto. Solapan el pico mayor del primer alelo con el segundo pico del segundo alelo. Este artefacto del primer alelo conduce a errores.
- Inestabilidad de microsatélites. Patrón en forma de corona o campana, con un pico central muy marcado y picos a derecha e izquierda decreciendo.

II. Casos informativos :

- Heterocigotos con pérdida de heterocigosidad.
- Heterocigotos sin pérdida de heterocigosidad.

Con los casos informativos se elabora una tabla calculando la relación entre áreas de los picos mayores de cada alelo (ratio).

Ratio = Área primer alelo / área segundo alelo

Se calcula para los dos tipos de células: linfocitos y mucosa oral. Se calcula la relación $\text{ratio mucosa} / \text{ratio linfocitos}$. Si esta relación es ≥ 1.5 ó ≤ 0.5 se dice que existe una pérdida de heterocigosidad. Es decir reducción de al menos un 50% del alelo delecionado con su correspondiente modificación en la proporción alélica.

RESULTADOS

VARIABLES CLÍNICAS

En el grupo tumoral, el 87,2% (41 casos) eran hombres frente a 12,8% (6 casos) mujeres. En el grupo de riesgo 63,2 % (72 casos) eran hombres frente a 36,8% (42 casos) mujeres. En el grupo control, 35,9% (14 casos) eran hombres frente a 64,1% (25 casos) mujeres. Tabla 4.

La edad media del grupo tumoral fue de 68.47 años, grupo de riesgo 59,85 años y en grupo control de 65,55 años. Se compara la edad entre los grupos mediante el ajuste de Bonferroni comprobando que el grupo de riesgo resulta significativamente más joven que el grupo tumoral y grupo control (Tabla 4).

		Tumoral	Riesgo	Control	P
Sexo	Varón	41(87,2%)	72(63,2%)	14(35,9%)	<0,001*
	Mujer	6(12,8%)	42(36,8%)	25(64,1%)	<0,001*
Edad		68,4(10,3)	59,8 (8,1)	65,5(14,6)	<0.001**

*Chi cuadrado de Pearson.

**Anova

Tabla 4. Expresión de frecuencias absolutas y relativas de las variables sexo y edad.

		Tumoral	Riesgo	Control	P
Tabaquismo	NF	1(2,1%)	0	39(100%)	<0.001*
	F	32(68,1%)	91(79,8%)	0	
	EF	14(29,8%)	23(20,2%)	0	
Cig/día		34,5(13,7)	30.4 (13,1%)	0	>0.05**
Años consumo		40.9 (12,1%)	33,9(9,3%)	0	<0.001**

*Chi Cuadrado de Pearson.

** T de student.

Tabla 5. Expresión de frecuencias absolutas y relativas de las variables relacionadas con el tabaquismo.

En el grupo tumoral el porcentaje de fumadores activos es del 68,1% frente a un 29,8% de ex fumadores e igual comportamiento tiene el grupo de riesgo (79,8% fumadores activos frente a 20,2% de ex fumadores). Resulta por tanto una mayor frecuencia de fumadores activos en los dos grupos (tumoral y de riesgo). Así mismo se objetiva que el grupo de pacientes con carcinoma broncogénico tienen un mayor tiempo de consumo de tabaco (7 años). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de riesgo y grupo tumoral con respecto al número de cigarrillos consumidos por día.

La estirpe histológica más frecuente fue la epidermoide 63,8% (28 hombres: 93,3% y 2 mujeres: 6,6%) seguido del adenocarcinoma 19,1% (6 hombres: 66,6% y 3 mujeres: 33,3%).

Estirpes tumorales

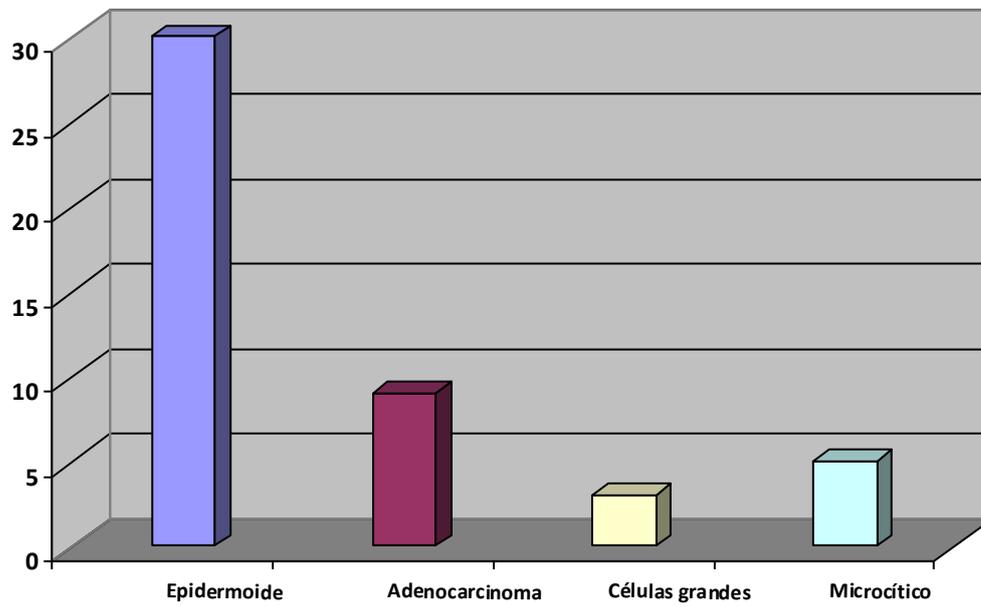


ILUSTRACIÓN 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DIAGRAMA DE BARRAS DE LAS DIFERENTES ESTIRPES TUMORALES.

La distribución por estadios muestra que el IB fue el más frecuente: 20(42,6%), seguido del IV: 9 (19,1%).

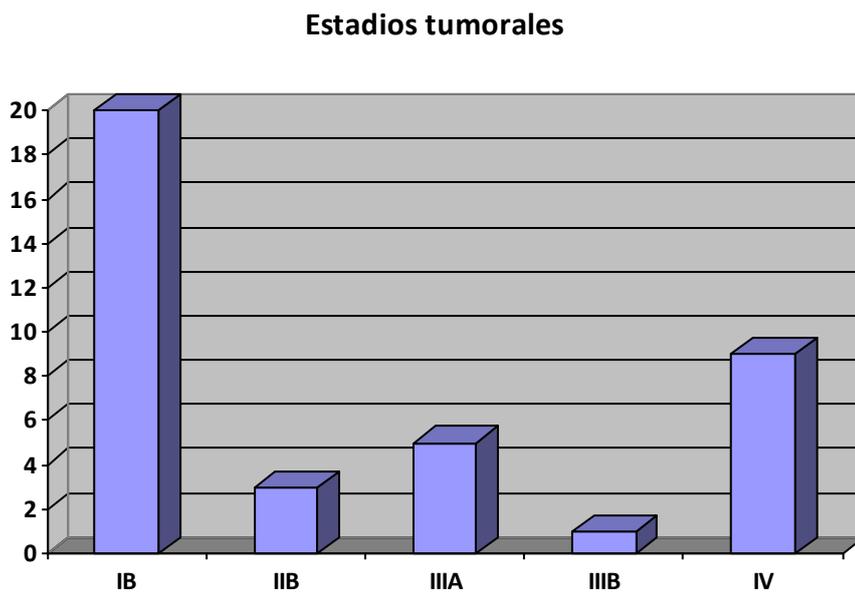


ILUSTRACIÓN 4. REPRESENTACIÓN GRAFICA DE LA DISTRIBUCIÓN POR ESTADIOS TUMORALES.

DISTRIBUCIÓN GENÓMICA

Los resultados de los patrones obtenidos en los tres genes supresores de tumores (p53, p16 y APC) a nivel de cavidad oral se muestran en las tablas 6, 7 y 8.

		Tumoral	Riesgo	Control	P
P53	PDH	7(14, 9%)	2(1, 8%)	2(5, 10%)	0,019*
	No informativo	17(36, 2%)	50(43, 9%)	19(48, 7%)	
	Heterocigoto	23(48, 9%)	62(54, 4%)	18(46, 2%)	

* Chi Cuadrado de Pearson.

TABLA 6 . PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN GENOMICA DE P53 EN CAVIDAD ORAL.

		Tumoral	Riesgo	Control	P
P16	PDH	5(10,6%)	3(2,6%)	0	0,042*
	No informativo	18(38,3%)	41(36%)	11(28,2%)	
	Heterocigoto	23(48,9%)	70(61,4%)	28(71,8%)	

* Chi Cuadrado de Pearson.

TABLA 7. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN GENOMICA DE P16 EN CAVIDAD ORAL.

		Tumoral	Riesgo	Control	P
APC	PDH	5(10,6%)	6(5,3%)	0	0,058*
	No informativo	17(36,2%)	62(54,4%)	17(43,6%)	
	Heterocigoto	25(53,2%)	46(40,4%)	22(56,4%)	

* Chi Cuadrado de Pearson.

TABLA 8. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN GENOMICA DE APC EN CAVIDAD ORAL.

Con respecto a p53 en muestras de cavidad oral, resulta estadísticamente significativa (p 0,019) la diferencia entre las pérdidas de heterocigosidad (PDH) halladas en el grupo tumoral (14,9%) frente al grupo de riesgo (1,8%) y grupo control (5,1%).

P16 en cavidad oral resulta estadísticamente significativa (p 0,042) con respecto a las diferencias halladas entre las PDH en el grupo tumoral (10,6%) respecto al grupo de riesgo (2,6%). No se detectaron PDH en las muestras de cavidad oral en el grupo control.

El porcentaje de PDH en el gen supresor APC no alcanza la significación estadística (p 0,058) en los tres grupos de estudio de nuestra serie.

ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA ESTIMACIÓN DEL RIESGO DE TUMOR

Primeramente analizamos el riesgo que tiene un sujeto de pertenecer al grupo tumoral cuanto tiene una pérdida de heterocigosidad en algunos de los genes objeto de estudio.

Los individuos con PDH en p53 en boca tienen 3 veces más riesgo (IC 95% 1.8-5,1) de padecer un tumor frente a los que no presentan PDH mostrando un riesgo significativo ($P = 0.001$). *Tabla 9.*

		Tumor	No tumor	RP(razón de prevalencia)
P53 boca	PDH	7(63%)	4(36.3%)	3 (1,8-5,1)
	No PDH	40(21,1%)	149(78,8%)	

TABLA 9. ESTIMACIÓN DEL RIESGO ANTE LA DETECCIÓN DE PDH EN P53 A NIVEL DE BOCA.

Los individuos con PDH en p16 en boca tienen 2.8 veces más riesgo (IC 95% 1.5-5,2) de padecer un tumor frente a los que no presentan PDH mostrando un riesgo significativo (P =0.001). *Tabla 10.*

		Tumor	No tumor	RP
P16 boca	PDH	5(62,5%)	3 (37,5%)	2,8(1,5-5,2)
	No PDH	42(21.8%)	150(78,1%)	

TABLA 10. ESTIMACIÓN DEL RIESGO ANTE LA DETECCIÓN DE PDH EN P16 A NIVEL DE BOCA.

En el caso del gen APC, no se observa que la presencia de PDH en cavidad oral suponga mayor riesgo de tener un carcinoma broncogénico, puesto que muestra una RP de 2 (IC 95% 1-4) con una $p = 0.077$. *Tabla 11.*

		Tumor	No tumor	RP
APC boca	PDH	5(45,4%)	6 (54,5%)	2(1,0-4,1)
	No PDH	42(22,2%)	147(77,7%)	

TABLA 11. ESTIMACIÓN DEL RIESGO ANTE LA DETECCIÓN DE PDH EN APC A NIVEL DE BOCA.

Así mismo hemos verificado otros factores de riesgo para carcinoma broncogénico. Nuestros resultados muestran que pertenecer al sexo varón supone un riesgo 4 veces superior frente al sexo mujer (IC 95% 1,7-8,8) *tabla 12* y el tabaquismo 11 veces más riesgo frente al no fumador (IC 95% 1,6-80,8) *tabla 13*.

		Tumor	No tumor	RP
Sexo	Varón	41(32,2%)	86(67,7%)	4(1,7-8,8)
	Mujer	6(8,2%)	67(91,7%)	

TABLA 12. ESTIMACIÓN DEL RIESGO POR SEXOS

		Tumor	No tumor	RP
Tabaquismo	Fumador o exfumador	46(28,7%)	114(71,2%)	11,5(1,6-80,8)
	No fumador	1(2,5%)	39(97,5%)	

TABLA 13. ESTIMACIÓN DEL RIESGO POR HÁBITO TABÁQUICO.

Los sujetos pertenecientes al grupo tumoral tenían una edad superior (media de 68.4 años) frente al grupo de riesgo y grupo control (media de 61,2 años) y la diferencia en el número de años de consumo de tabaco era estadísticamente significativa ($p=0,001$) en el grupo tumoral (40,89 años) con respecto al grupo de riesgo (33,89 años). *Tabla 14.*

	Tumoral	Riesgo y Control	P
Edad	68,4 (10,3)	61,2(10,4)	<0,001*
Cig/día	34,5(13,7)	30,4(13,1)	0,073*
Años consumo	40,9(12,1)	33,9(9,3)	<0,001*

* T Student

TABLA 14. DIFERENCIAS EN EDAD Y HÁBITO DE CONSUMO DE TABACO ENTRE GRUPOS.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PREDICTORES DE RIESGO INDEPENDIENTE.

Una vez identificadas las variables relacionadas con la pertenencia al grupo tumoral en el análisis univariante del punto anterior, se realiza un análisis de regresión logística por el método de pasos hacia delante (condicional) tabla 15. En el modelo obtenido, se identifican como variables independientes relacionadas con la existencia de un carcinoma broncogénico ($r^2 = 0,430$, $p < 0.001$): sexo varón, edad, fumador activo o exfumador, presentar PDH en p53 y/o p16 en cavidad oral.

	Chi Cuadrado	gl	Sig
Paso	3,846	1	0,050
Bloque	57,698	6	0,000
Modelo	57,698	6	0,000

TABLA 15 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIPLE.

Prueba Omnibus sobre los coeficientes del modelo.

Resumen de los modelos

2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
136,747	0,301	0,430

Variables en la ecuación.

	B	E.T	Wald	P. Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Género	1451	0,602	5,816	0,016	4,269	1,312	13,889
Edad	0,118	0,024	23,517	0,000	0,889	0,848	0,932
Fumador	-11,500	22,257	0,267	0,605	0,000	0,000	8,9E+13
P53Boca	2,022	0,891	5,151	0,023	7,552	1,318	43,284
P16Boca	1,924	0,885	4,733	0,030	6,851	1,210	38,782
APC	1,497	0,754	3,946	0,047	4,467	1,020	19,562
Constante	3,114	1,981	2,714	0,099	22,521		

ANÁLISIS DE RENTABILIDAD POR SUBGRUPOS

Una vez identificada que la presencia de PDH en p53 y p16 en células de la cavidad oral se relaciona con la asignación al grupo tumoral, se trata ahora de identificar los subgrupos de sujetos en los que estos parámetros podrían ser más rentables.

En el caso de los varones, la presencia de PDH en p53 en la cavidad oral muestra una razón de prevalencia 2,5 veces superior frente al que no presenta PDH, con una significación estadística de $p = 0,008$ (tabla 16), mientras que p16 (tabla 17) y APC no alcanzan significación (Tabla 18).

	Tumor	No tumor	p = 0,008* RP: 2,550 (1,566- 4,151)
PDH	6(75%)	2(25%)	
No PDH	35(29,4%)	84(70, 5%)	

**Chi cuadrado de Pearson*

TABLA 16. EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE P53 BOCA EN SUJETOS VARONES

	Tumor	No tumor	p = 0,065* RP: 2,180 (1,166- 4,078)
PDH	4(66,6%)	2(33,3%)	
No PDH	37(30.5%)	84(69,4%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson.*

TABLA 17 *EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE P16 BOCA EN SUJETOS VARONES*

	Tumor	No tumor	$p = 0,121^*$ RP: 1,821 (0,956- 3,470)
PDH	5(55,5%)	4(44,4%)	
No PDH	36(30,5%)	82(69,5%)	

** Chi Cuadrado de Pearson*

TABLA 18. EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE APC BOCA EN SUJETOS VARONES

En el caso de fumadores activos o exfumadores, la PDH en p53 en cavidad oral muestra una razón de prevalencia significativa de 3,01 con una $p = 0,001$ (tabla 19) y para p16 de 2,3 con una $p = 0,030$ (Tabla 20). Para APC no se alcanza la significación estadística (Tabla 21).

	Tumor	No tumor	p < 0,001* RP: 3,011 (1,936- 4,683)
PDH	7(77,7%)	2(22,2%)	
No PDH	39(25,8%)	112(74,1%)	

** Chi Cuadrado de Pearson*

TABLA 19 EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE P53 EN BOCA DE SUJETOS FUMADORES O EXFUMADORES

	Tumor	No tumor	p = 0.030* RP: 2,317 (1,275- 4,210)
PDH	5(62,5%)	3(37,5%)	
No PDH	41(27%)	111(73%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson.*

TABLA 20. EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE P16 EN BOCA DE SUJETOS FUMADORES O EXFUMADORES

	Tumor	No tumor	p = 0,205* RP: 1652 (0,822- 3,319)
PDH	5(45,4%)	6(54,5%)	
No PDH	41(27,5%)	108(72,4%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson.*

TABLA 21. EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE APC EN BOCA DE SUJETOS FUMADORES O EXFUMADORES

Por último, en hombres fumadores activos o exfumadores, sólo la presencia de PDH en p53 en cavidad oral muestra una razón de prevalencia significativa de 2.2 ($p = 0,018$) para la asignación al grupo tumoral (*Tabla 22*), mientras que para p16 (*tabla 23*) y APC (*tabla 24*) no se alcanza la significación estadística.

	Tumor	No tumor	p = 0,018* RP: 2,250 (1,388- 3,647)
PDH	6(75%)	2(25%)	
No PDH	35(33,3%)	70(66,6%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson.*

TABLA 22. EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE P53 EN BOCA DE HOMBRES FUMADORES O EXFUMADORES.

	Tumor	No tumor	p = 0,112* RP: 1,928 (1,034- 3,594)
PDH	4(66,6%)	2(33,3%)	
No PDH	37(34,5%)	70(65,4%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson.*

TABLA 23 . EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE P16 EN BOCA DE HOMBRES FUMADORES O EXFUMADORES.

	Tumor	No tumor	p = 0,210* RP: 1,605 (0,845- 3,048)
PDH	5(55,5%)	4(44,4%)	
No PDH	36(34,6%)	68(65,3%)	

* *Chi Cuadrado de Pearson*

TABLA 24 . EXPRESIÓN DE FRECUENCIAS RELATIVAS Y ABSOLUTAS DE APC EN BOCA DE HOMBRES FUMADORES O EXFUMADORES.

ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS MUESTRAS TUMORALES

Se presentan los resultados obtenidos para las tres localizaciones (p53, p16 y APC). Ilustración 5,6 y 7.

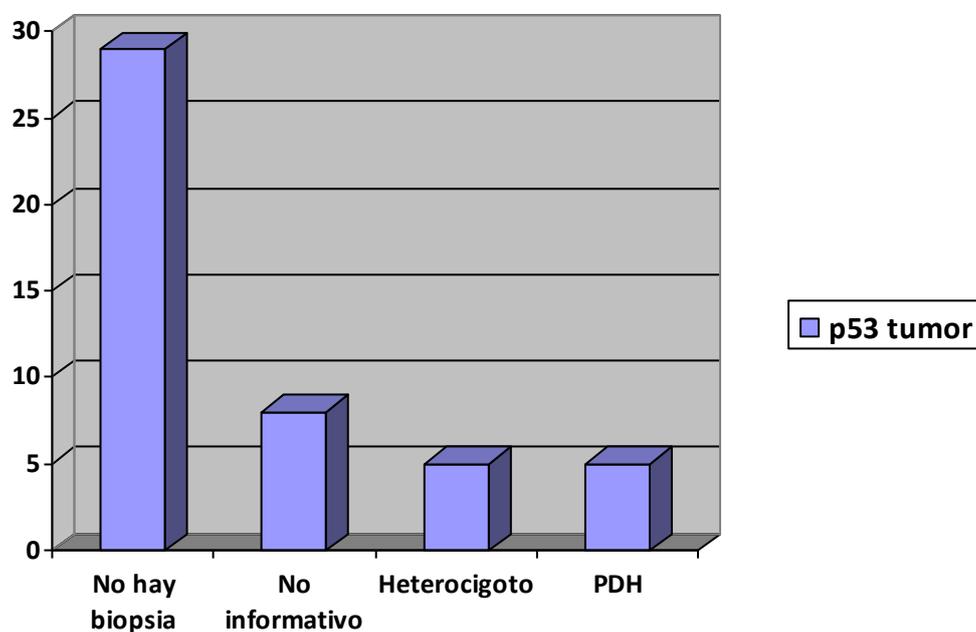


ILUSTRACIÓN 5 REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE LA PREVALENCIA DE P53 EN MUESTRAS TUMORALES.

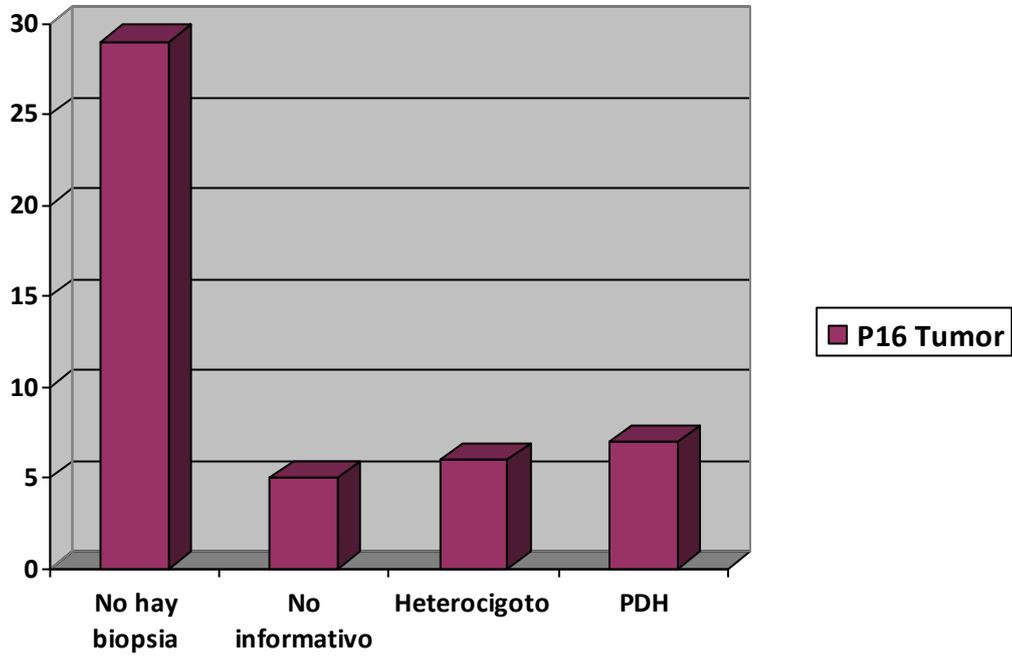


ILUSTRACIÓN 6 REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE LA PREVALENCIA DE P16 EN MUESTRAS TUMORALES.

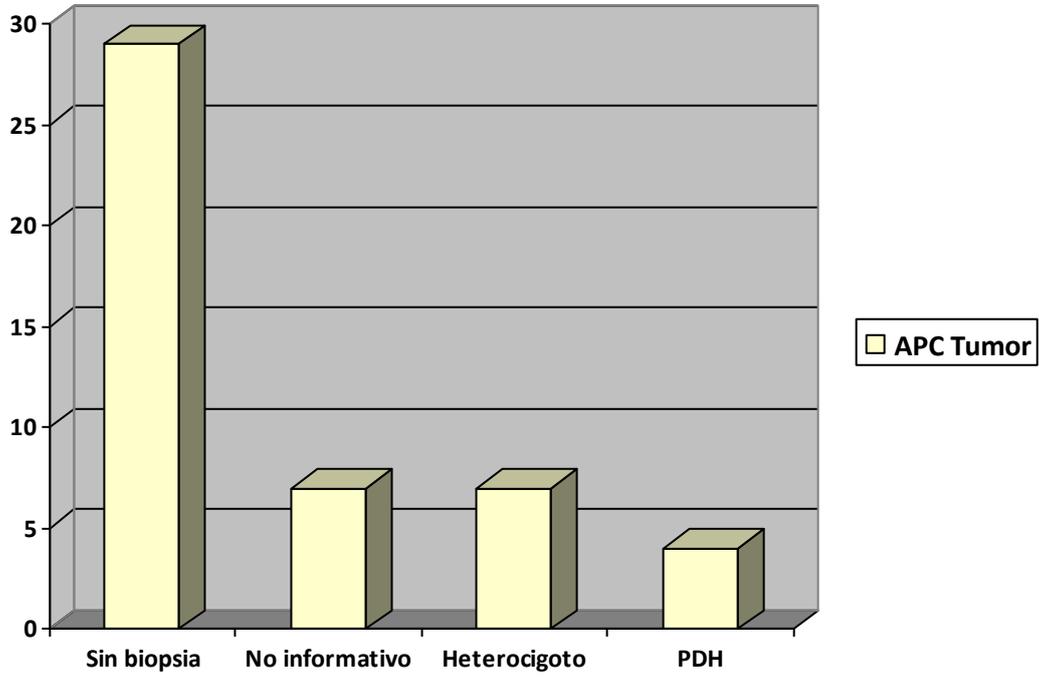


ILUSTRACIÓN 7 ILUSTRACIÓN 8 REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE LA PREVALENCIA DE APC EN MUESTRAS TUMORALES.

Se analiza la concordancia entre el resultado obtenido con las muestras en boca y en tumor (tabla 25, 26 y 27), obteniendo un coeficiente kappa de:

0,493 (p=0,006) para p53, que corresponde a una concordancia moderada.

0,670 (p<0,001) para p16, que corresponde a una concordancia buena

0,824 (p<0,001) para APC, que indica una concordancia muy buena

	P 53 tumor				
		PDH	NI	H	
P53 boca	PDH	2	0	2	P = 0,006* Kappa 0,493
	NI	0	7	0	
	H	3	1	3	

* Chi Cuadrado de Pearson

PDH. Pérdida de heterocigosidad

NI. No informativo

H. Heterocigoto.

TABLA 25 ANALISIS DE CONCORDANCIA EN MUESTRAS TUMORALES VS MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL. P53

	P 16 tumor				
P16 boca		PDH	NI	H	P < 0,001* Kappa 0,670
	PDH	3	0	0	
	NI	0	5	0	
	H	4	0	6	

* Chi Cuadrado de Pearson.

TABLA 26 ANALISIS DE CONCORDANCIA EN MUESTRAS TUMORALES VS MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL. P16

	APC tumor				
		PDH	NI	H	
APC boca	PDH	2	0	0	P < 0,001* Kappa 0,824
	NI	0	7	0	
	H	2	0	7	

* Chi Cuadrado de Pearson.

TABLA 27. ANALISIS DE CONCORDANCIA EN MUESTRAS TUMORALES VS MUESTRAS DE CAVIDAD ORAL. APC.

DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón se ha convertido a nivel mundial en un problema de salud pública siendo considerado por algunos sectores como la epidemia del siglo XXI. Los datos epidemiológicos reflejan la creciente necesidad de desarrollar mejores métodos para la detección precoz de esta patología, cuyo principal objetivo sería disminuir la mortalidad y en el caso de las lesiones precursoras, disminuir la incidencia.

Hoy día la principal esperanza de tratamiento curativo para el cáncer de pulmón es la resección quirúrgica de la lesión pulmonar y es por ello que las lesiones tienen que ser detectadas precozmente. Sólo 1 de cada 4 pacientes se detecta a tiempo para cirugía. Cuando estos tumores producen sintomatología, están a menudo en estado avanzado y su pronóstico es fatal con una supervivencia media del 15% a los 5 años.

Ensayos previos en cribado poblacional con realización de frecuentes radiografías de tórax o análisis citológico de esputo, no han demostrado todavía un claro efecto en reducción de la mortalidad (97). Por lo que respecta al uso de TAC existen actualmente en marcha ensayos clínicos randomizados pero recientes trabajos ya han comunicado que tampoco se la reduce (98).

Actualmente la investigación en diagnóstico precoz va encaminada a la detección de biomarcadores que puedan ser empleados para valorar diversos aspectos de la enfermedad tales como la predisposición genética, el diagnóstico precoz de la enfermedad en fase pre-clínica, valoración del pronóstico cuando la enfermedad está en fase clínica o la posible respuesta a quimioterapia en la fase avanzada de enfermedad. La aportación de la genómica supone uno de los métodos más prometedores en la investigación de la detección precoz del cáncer de pulmón pero, hasta la fecha, todos los estudios tienen un carácter experimental.

El objeto de nuestro estudio fue determinar la posible utilidad de la detección de PDH en los loci cromosómicos 17p13 (p53), 9p21 (p16) y 5q21 (APC), en muestras de material citológico de cavidad oral como método selectivo en poblaciones con riesgo para carcinoma broncogénico. El empleo de células de la mucosa oral como muestra de estudio, responde a la necesidad de encontrar una muestra de fácil acceso y cuya obtención no suponga el empleo de métodos invasivos.

De los actuales métodos no invasivos empleados hasta la fecha, el esputo es el material biológico más comúnmente empleado y ha sido utilizado para detectar células cancerosas pero no suele ser siempre representativo dado que cada esputo puede contener células de diversas partes de la vía aérea. Un esputo positivo no indica necesariamente un estadio precoz de la enfermedad. El rendimiento en general es bajo, especialmente en lesiones periféricas, fenómeno que también se ve influenciado por la calidad del esputo, técnica de obtención, número de esputos recogidos etc. La citología de esputo cobra un especial interés cuando se estudian los cambios que tienen lugar en células no tumorales, pero que se hallan en la proximidad del tumor. Se pueden diagnosticar así lesiones premalignas tanto en lo

que se refiere a alteraciones morfológicas precursoras como mediante la aplicación de técnicas de biología molecular que permitan detectar alteraciones celulares preneoplásicas (99-101).

Muestras inadecuadas de esputo son relativamente frecuentes y en algunas series supone hasta un 30% de las muestras. Un esputo no inducido suele contener gran cantidad de células escamosas procedentes de cavidad oral y vías aéreas altas, una escasa cantidad de macrófagos alveolares y de células epiteliales bronquiales.

Debido a estos inconvenientes se han desarrollado técnicas como combinar técnica FISH (Hibridación fluorescente in situ) más citología convencional de esputo (102) mejorando considerablemente los porcentajes de sensibilidad. Estos estudios han detectado anomalías genéticas en 3p21 y 10q22.3 tanto en células normales como atípicas procedentes del esputo de sujetos fumadores y exfumadores sin cáncer broncogénico lo que concuerda con el llamado efecto de cancerización de campo para células bronquiales.

Otro tipo de material empleado es la sangre aunque actualmente está en fase experimental. El uso de sangre puede ofrecer especiales ventajas sobre todo en programas de cribado. Es fácil de acceder pero el uso de medicamentos o dietas pueden influir significativamente en el resultado (103). Se han realizado estudios principalmente encaminados a la detección de alteraciones microsatélites en pacientes diagnosticados de cáncer no microcítico (104, 105) pero no están suficientemente avalados para su empleo en políticas de cribado de carcinoma de pulmón.

Tras la realización de una revisión de la literatura (MEDLINE 1980-2009) no se han encontrado estudios similares en los que se utilicen células de la mucosa oral como muestra para estudios de detección precoz de cáncer de pulmón. El empleo de este tipo de muestra se basó asumiendo la teoría de la cancerización de campo.

El concepto de cancerización de campo fue introducido por primera vez en 1953 por Slaughter et al (106) mientras estudiaba el cáncer de boca. Autores como Braakhuis (107) definen la cancerización de campo como la presencia de uno ó más agrupamientos de células epiteliales de origen monoclonal que contienen alteraciones genéticas. Para estos autores una lesión de campo equivaldría a una lesión pretumoral y tendría las mismas características histológicas que una displasia. El modelo de carcinogénesis se podría, por tanto, explicar a partir de una o varias alteraciones genéticas en una célula madre que formaría una “zona caliente” que escaparía del normal control de crecimiento y se expandiría desplazando al epitelio normal.

El concepto de cancerización de campo tiene importantes consecuencias clínicas porque es bien conocido el hecho de que el área periférica a los límites de resección tumoral tiene un alto riesgo de desarrollar un nuevo tumor aunque se haya informado de bordes de resección limpios. Por tanto, es fundamental identificar las zonas de campo con células alteradas genéticamente porque suponen un continuo riesgo de cáncer y entre éstas destacamos la cavidad oral ya que es la primera zona de contacto con el humo de tabaco y es presumible que se puedan localizar las llamados “zonas calientes” tanto en boca como en pulmón de sujetos con diagnóstico de cáncer de pulmón.

Una vez seleccionado el tipo de muestra biológica en la que se realizarían los estudios moleculares debíamos seleccionar los biomarcadores objeto de estudio. Las características que debe reunir un biomarcador para poder ser empleado en métodos de cribado son:

- Diferente expresión en células pre-neoplásicas en relación a las células normales
- Estar presente en muestras obtenidas de forma mínimamente invasiva.
- Ser un sistema bien establecido para cuantificar sus niveles.
- Ser estable en el tiempo y con el procesamiento de las muestras.
- Ser un método rutinario y automatizado de análisis.

Hoy día no existen biomarcadores aprobados que identifiquen que fumadores o ex fumadores desarrollarán un cáncer de pulmón. Últimamente se han desarrollado estudios como el empleo de micro matrices de ADN en células citológicamente sanas de la vía aérea (108-110) o en linfocitos de sangre periférica (111) de sujetos no fumadores, ex fumadores o fumadores activos. Los resultados de estos estudios sugieren que es posible detectar qué fumadores son susceptibles de desarrollar cáncer de pulmón.

Estudios en genómica han hallado que el perfil de expresión genético es diferente entre el adenocarcinoma del fumador con respecto al del no fumador, de tal manera que en el primer caso se detectan preferentemente altos niveles de metilación aberrante del ADN, transversiones de bases de p53 (50%), mutaciones

K ras (30%) y aberraciones cromosómicas en 3p, 6q, 9p, 16p, 17p y 19p. En el caso del no fumador predominan una alta incidencia de mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), transiciones de bases en p53, así como una baja tasa de metilación aberrante del ADN (112).

Spira et al (113,114) encuentran que el tabaquismo induce cambios en el perfil de expresión genético que pueden ser reversibles en el exfumador siempre y cuando no haya desarrollado un carcinoma broncogénico e identifican al menos 80 biomarcadores genéticos que distinguen con un 90% de sensibilidad, al fumador con cáncer broncogénico respecto del fumador sin cáncer broncogénico. En correlación a este estudio, Boelens et al (115) encuentran al menos 246 genes (111 sobreexpresados y 135 infraexpresados) que se expresan de diferente manera en el epitelio bronquial sano de un fumador con respecto a un exfumador. Comparando 16 muestras de epitelio bronquial sano de exfumadores con carcinoma epidermoide encuentran que al menos 54 genes de los sobreexpresados también lo están en el tejido neoplásico. Mientras que 123 de los infraexpresados también están en la misma situación en el tejido neoplásico. Cuando analizan células de epitelio bronquial sano en un fumador activo con cáncer broncogénico, encuentran 24 genes de los 111 sobreexpresados y 107 genes de los 135 infraexpresados. Todo esto nos viene a decir que los cambios genéticos producidos por el humo del tabaco son significativamente persistentes en el sujeto con cáncer broncogénico, independientemente de su status de fumador y que estos hallazgos se pueden localizar en su tejido bronquial sano distante al tumor lo que se correlaciona con la teoría anteriormente citada de la cancerización de campo, que sostiene que el humo del tabaco va creando a su paso

por la vía aérea, agrupamientos celulares de origen monoclonal con alteraciones genéticas que pueden ser eventos precoces de la carcinogénesis.

Hasta la fecha tampoco hay datos concluyentes de que técnicas de análisis molecular son por sí mismas útiles como método de cribado pero, probablemente, en un futuro la combinación de varias de ellas pueda demostrar su utilidad.

En nuestro estudio se optó por la selección de tres genes implicados en la vía supresora de tumores (p53, p16 y APC) en base a una exhaustiva revisión de la literatura y a criterios de disponibilidad del material preciso para dicho estudio.

Las pérdidas de heterocigosidad (PDH) de genes supresores de tumores se señalan en varios estudios, como eventos precoces de la carcinogénesis pulmonar relacionados con el consumo de tabaco, sin ser necesariamente diagnóstico de carcinoma broncogénico (24, 25, 105).

Resulta por tanto importante dilucidar qué porcentaje de llamados falsos positivos de neoplasia se pueden encontrar. Hasta la fecha no podemos determinar qué tipo de seguimiento debería hacerse en un paciente con detección de PDH en alguno de sus genes supresores.

Tampoco está claramente acordado que perfil debería reunir un sujeto para ser incluido en un programa de cribado para carcinoma broncogénico. Un dato importante para futuras estrategias es la de incluir tanto fumadores como exfumadores dado que al menos el 50% de los carcinomas broncogénicos se diagnostican en exfumadores. Según los estudios epidemiológicos publicados de la Encuesta Nacional de Salud de 2006, el porcentaje de fumadores varones es más alto que el de las mujeres (31,6% versus 21,5%). En cuanto al tabaquismo pasivo

el riesgo relativo de desarrollar un carcinoma broncogénico no microcítico oscila entre 1,24 - 1,48 en relación con los que no tienen contacto habitual con fumadores (18, 116). Hasta la fecha no se ha contemplado incluir a los sujetos expuestos de forma pasiva en programas de detección precoz pero pensamos que debería no excluirse esta posibilidad.

Otro de los objetivos del estudio fue definir las características del llamado grupo de riesgo ateniéndose a la presencia o no de alteraciones en determinados genes supresores de tumores en cavidad oral. Actualmente se estima que la incidencia de cáncer de pulmón en una población llamada de riesgo es de un 15% (117).

En nuestra serie la mayoría de los pacientes del grupo tumoral son varones (87,2%). A partir de los registros de tumores realizados a nivel mundial sabemos que existe una tendencia ascendente en las tasas de cáncer broncogénico en las mujeres españolas desde hace aproximadamente 20 años, pero en los varones desde el año 2001, las cifras experimentaron cierta variabilidad en función de las comunidades autónomas.

La edad media en nuestra serie es más avanzada en el grupo tumoral (68.7 años) lo que coincide con los datos existentes a nivel nacional que confirman que el carcinoma broncogénico es una enfermedad más prevalente en las personas con edades superiores a los 60 años (118). La comparación de grupos refleja que el grupo de riesgo resulta significativamente más joven que los otros dos grupos: grupo de riesgo (59,85 años) y grupo control (65,5 años).

La estirpe histológica más frecuente fue la epidermoide (63.8%) seguido del adenocarcinoma (19.1%). Estos datos son concordantes a los descritos en las

series nacionales, entre los que los tumores epidermoides son con diferencia los más frecuentes (9,119).

Con respecto al estudio de las muestras de cavidad oral se objetiva que las PDH a nivel de p53 y p16 son estadísticamente significativas en el grupo tumoral con respecto al grupo de riesgo y grupo control, lo que está en correlación con la idea de los pacientes con diagnóstico de carcinoma broncogénico evidencian más PDH y que éstas se pueden localizar tanto en tumor como en regiones distantes al mismo .

Pensamos que en nuestro estudio, un mayor número de biopsias de carcinoma broncogénico habría determinado también una mayor significación estadística para el gen APC.

Uno de los puntos centrales de nuestro estudio era definir qué riesgo tiene un sujeto de pertenecer al grupo tumoral cuando se le detecta una pérdida de heterocigosidad en la cavidad oral. En nuestra serie tener una PDH en p53 y/o p16 a nivel de cavidad oral supone un mayor riesgo de tener un carcinoma broncogénico.

Así mismo hemos verificado otros factores añadidos para pertenecer al grupo de riesgo, como es pertenecer al sexo varón (riesgo relativo de 4) y el tabaquismo activo (riesgo relativo 11.5).

También se desprende del análisis que los sujetos pertenecientes al grupo tumoral tenían más edad (media de 68,4 años) frente a los pertenecientes al grupo de riesgo y grupo control (media de 61,2 años) y que la diferencia en el número de años de consumo de tabaco era estadísticamente significativa en el grupo tumoral

con respecto al grupo de riesgo, lo cual interpretamos como dos nuevos factores de riesgo añadidos aunque ya conocidos en la literatura.

No se han objetivado en nuestra serie diferencias estadísticamente significativas entre grupo tumoral y grupo de riesgo en lo referente a la influencia de un mayor o menor consumo de tabaco.

El análisis multivariante para la identificación de factores predictores de riesgo que actúan como variables independientes relacionadas con la existencia de carcinoma broncogénico, estima que dichos factores serían el sexo, edad, hábito tabáquico y presentar PDH en p53 y/o p16 en cavidad oral. Por lo tanto pensamos que dichas variables deberían ser tenidas en cuenta a la hora de diseñar un programa de diagnóstico precoz de carcinoma broncogénico.

Una vez ya determinado que presentar PDH en p53 y p16 es un factor de riesgo para carcinoma broncogénico tratamos de determinar en qué subgrupos de sujetos sería útil hacer un seguimiento.

Se estima con nuestro estudio que ser ,exfumador u fumador activo con detección de PDH en p53 y/o p16 en cavidad oral son factores adecuados para entrar en un grupo de riesgo independientemente del sexo.

En nuestra serie el porcentaje de pacientes pertenecientes al grupo tumoral y de los que no se disponía de muestra biológica para los estudios genéticos fue elevado (61,7%). Este hecho fue debido a que con frecuencia nos encontramos que las muestras de pequeño tamaño obtenidas por técnicas endoscópicas se habían agotado durante su procesamiento para estudio citológico e histológico.

Los llamados casos no informativos fueron de un 17% para p53, 10,6% para p16 y 14.9% para APC en el grupo tumoral. Estos casos aunque válidos se correspondían con sujetos que mostraban homocigosidad, o bien se diferenciaban en un par de bases o muestran alteraciones microsatélites tipo inestabilidad. Pensamos, por tanto, que para estudios de este tipo deben ser obtenidas mayor número de muestras que las habituales en técnicas endoscópicas y que deben ir identificadas exclusivamente para estudio de alteraciones genéticas.

Se analizó la concordancia entre el resultado obtenido con las muestras en boca y en tumor obteniendo una concordancia moderada para p53, buena para p16 y muy buena para APC. La elevada concordancia de APC entre muestras de boca y tumor nos hace plantear que aunque no obtuvimos una significación estadística para afirmar que las PDH en APC a nivel de cavidad oral fuesen un factor de pronóstico, probablemente deberíamos tenerlo también en cuenta. Posiblemente un mayor número de casos estudiados en la población tumoral hubiese elevado la significación estadística que en nuestra serie fue de $p = 0,07$.

CONCLUSIONES

- 1) En nuestra serie el grupo tumoral tenía una historia tabáquica de mayor duración respecto al grupo de riesgo. El número de años de exposición al consumo de tabaco supone un factor pronóstico más significativo para carcinoma broncogénico que el grado de consumo de tabaco.
- 2) El grupo tumoral presenta un mayor porcentaje de pérdidas de heterocigosidad en el gen p53 y p16 a nivel de mucosa oral que el grupo de riesgo y grupo control.
- 3) En nuestra serie la detección de pérdidas de heterocigosidad en los genes p53 y p16 en muestras de mucosa oral supone un factor pronóstico significativo para carcinoma broncogénico.
- 4) La presencia de pérdida de heterocigosidad en el gen APC en mucosa oral no resulta estadísticamente significativa en los tres grupos de estudio, por lo que no podemos afirmar su utilidad como marcador pronóstico para carcinoma broncogénico.
- 5) Las variables sexo varón, edad > 60 años, fumador activo o exfumador y presentar pérdida de heterocigosidad en p53 y/o p16 en cavidad oral pueden actuar como factores de riesgo relacionados con la existencia de carcinoma broncogénico.

- 6) El grado de concordancia entre las muestras obtenidas en cavidad oral y en tumor fue moderada para p53, buena para p16 y muy buena para APC.
- 7) El empleo de material citológico exfoliado de cavidad oral puede ser útil para estudios de cribado poblacional en carcinoma broncogénico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Defunciones según la causa de muerte en España 2008. Instituto Nacional de Estadística. Disponible en <http://cne.isciii.es/>.
2. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: A review. *J Clin Oncol.* 2007; 25(5):561-70.
3. Gazdar AF, Thun MJ. Lung cancer, smoke exposure, and sex. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):469-71.
4. Patel JD, Bach PB, Kris MG. Lung cancer in US women - A contemporary epidemic. *JAMA.* 2004; 291(14):1763-8.
5. Henschke CI, Miettinen OS. Women's susceptibility to tobacco carcinogens. *Lung Cancer.* 2004;43(1):1-5.
6. Risch HA, Miller AB. Re: Are women more susceptible to lung cancer? *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(20):1560.
7. Sanchez de Cos Escuin J, Miravet Sorribes L, Abal Arca J, Nunez Ares A, Hernandez Hernandez J, Castanar Jover AM, et al. The EpicliCP-2003 study: A multicenter epidemiological and clinical study of lung cancer in Spain. *Arch Bronconeumol.* 2006;42(9):446-52.

8. Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, et al. Differences between small-cell lung cancer and non-small-cell lung cancer among tobacco smokers. *Lung Cancer*. 2007; 56(2):161-6.
9. Janssen-Heijnen MLG, Coebergh JWW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2003;41(3):245-58.
10. Doll R, Peto R. The causes of cancer-quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United-States today . *J Natl Cancer Inst*. 1981;66(6):1191.
11. Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW. What are the odds that smoking will you. *Am J Public Health*. 1987;77(4):425-31.
12. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med*. 2002;252(3):206-24.
13. Doll R, Hill AB. A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J*. 1952; 2(4797):1271-86.
14. Janssen-Heijnen MLG, Coebergh JWW. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. *Lung Cancer*. 2001;31(2-3):123-37.
15. Mannino DM, Ford E, Giovino GA, Thun M. Lung cancer mortality rates in birth cohorts in the United States from 1960 to 1994. *Lung Cancer*. 2001; 31(2-3):91-9.
16. Takkouche B, GestalOtero JJ. The epidemiology of lung cancer: Review of risk factors and Spanish data. *Eur J Epidemiol*. 1996;12(4):341-9.

17. Peto R. Influence of dose and duration of smoking on lung cancer rates. IARC Sci Publ. 1986(74):23-33.
18. Zhong LJ, Goldberg MS, Parent ME, Hanley JA. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. Lung Cancer. 2000; 27(1):3-18.
19. Bennett WP, Alavanja MCR, Blomeke B, Vahakangas KH, Castren K, Welsh JA, et al. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. J Natl Cancer Inst. 1999;91(23):2009-14.
20. Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, et al. The International Association for the study of Lung Cancer - Lung Cancer staging project: Proposals regarding the clinical staging of small cell Lung Cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2007; 2(12):1067-77
21. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. N Engl J Med. 1961; 265(6):253
22. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. Br Med J. 2000; 321(7257):323-9.
23. Knudson AJ. Genetics of human cancer. Genetics. 1975 Jun;79 Suppl:305-16.

24. Mao L, Lee J, Kurie J, Fan Y, Lippman S, Lee J, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jun; 89(12):857-62.
25. Wistuba I, Lam S, Behrens C, Virmani A, Fong K, LeRiche J, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Sep;89(18):1366-73.
26. Burns D. Primary prevention, smoking, and smoking cessation: implications for future trends in lung cancer prevention. *Cancer.* 2000 Dec; 89(11 Suppl):2506-9.
27. Wiencke J, Thurston S, Kelsey K, Varkonyi A, Wain J, Mark E, et al. Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr;91(7):614-9.
28. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of Ras. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62:851-91.
29. Vachtenheim J, Horakova I, Novotna H, Opalka P, Roubkova H. mutations of k-Ras oncogene and absence of H Ras mutations in squamous-cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 1995;1(3):359-65.
30. Westra WH, Slebos RJC, Offerhaus GJA, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, et al. K-Ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers-evidence that K-Ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 1993; 72(2):432-8.

31. Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, Leriche J, Horsman D, Nouvet G, et al. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res.* 1995; 55(22):5133-9.
32. Rabiasz GJ, Langdon SP, Bartlett JMS, Crew AJ, Miller EP, Scott WN, et al. Growth-control by epidermal growth-factor and transforming growth factor - alpha in human lung squamous carcinoma-cells. *Br J Cancer* 1992;66(2):254-9.
33. Gorgoulis V, Aninos D, Mikou P, Kanavaros P, Karameris A, Joardanoglou J, et al. Expression of EGF, TGF-ALPHA and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 1992; 12(4):1183-8.
34. Kristiansen G, Petersen YYS, Kaufmann O, Schluns K, Dietel M, Petersen I. Overexpression of c-erbB2 protein correlates with disease-stage and chromosomal gain at the c-erbB2 locus in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2001; 37(9):1089-95.
35. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol.*1993;20(2):105-27.
36. Shriver SP, Bourdeau HA, Gubish CT, Tirpak DL, Davis ALG, Luketich JD, et al. Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: Relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(1):24-33.
37. Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW, Gazdar AF, Carney DN, Oie H, et al. MYC Family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patientes and its relationship to clinical status and course *J Clin. Invest.*1987;79(6):1629-34.

38. Mishina T, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Hommura F, Morikawa T, Katoh H, et al. Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome. *Br J Cancer*. 1999; 80(8):1289-95.
39. Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Gaeta P, et al. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 1998; 75(2):187-92.
40. Wu WG, Fan YH, Kemp BL, Walsh G, Mao L. Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Res*. 1998;58(18):4082-5.
41. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Lin D, Hong WK, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res*. 2000; 60(15):4000-4.
42. Mishina T, Dosaka-Akita H, Hommura F, Nishi M, Kojima T, Ogura S, et al. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2000;6(1):11-6.
43. Vousden KH. p53: Death star. *Cell*. 2000; 103(5):691-4.
44. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 Functions and dysfunction. *Cell*. 1992; 70(4):523-6.
45. Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo a pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 1996; 274(5286):430-2.

46. Tseng JE, Rodriguez L, Ro J, Liu D, Hong WK, Mao L. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(22):5666-70.
47. Notterman D, Young S, Wainger B, Levine AJ. Prevention of mammalian DNA reduplication, following the release from the mitotic spindle checkpoint, requires p53 protein, but not p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene.* 1998; 17(21):2743-51.
48. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, et al. P53 Immunostaining positivity is associated with gene mutations in resected nonsmall cell lung cancer. A preliminary report of LCSG-871. *Chest.* 1994; 106(6):S377-S81.
49. Ponticiello A, Barra E, Giani U, Bocchino M, Sanduzzi A. p53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J.* 2000; 15(3):547-52.
50. Kamb A, Gruis NA, Weaverfeldhaus J, Liu QY, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A Cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994; 264(5157):436-40.
51. Sanchez-Cespedes M, Decker PA, Doffek KM, Esteller M, Westra WH, Alawi EA, et al. Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res.* 2001; 61(5):2092-6.
52. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1998; 95(20):11891-6.

53. Gazzeri S, Gouyer V, Vourc'h C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16(INK4A) inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene*. 1998; 16(4):497-504.
54. Sozzi G, Torielli S, Tagliabue E, Sard L, Pezzella F, Pastorino U, et al. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res*.1997; 57(23):5207-12.
55. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*. 1996; 85(1):17-26.
56. Tseng JE, Kemp BL, Khuri FR, Kurie JH, Lee JS, Zhou X, et al. Loss of Fhit is frequent in stage I non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Res*.1999; 59(19):4798-803.
57. Ohgaki H, Kros JA, Okamoto Y, Gaspert A, Huang H, Kurrer MO. APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett*. 2004; 207(2):197-203.
58. Sanz-Ortega J, Valor C, Saez MC, Ortega L, Sierra E, Poch J, et al. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol. Histopathol*. 2003 Oct; 18(4):1053-7.
59. Sanz-Ortega J, Hernandez S, Saez MC, Sierra E, Sanz-Ortega G, Torres A, et al. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13.1 allelic deletions are potential markers of individuals with a high risk of developing adenocarcinoma in Barrett's epithelium without dysplasia. *Hepatogastroenterology*. 2003 Mar-Apr; 50(50):404-7.

60. Ueno K, Kumagai T, Kijima T, Kishimoto T, Hosoe S. Cloning and tissue expression of cDNAs from chromosome 5q21-22 which is frequently deleted in advanced lung cancer. *Hum. Genet.*1998; 102(1):63-8.
61. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Tumor progression and loss of heterozygosity at 5q and 18q in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res.*1995; 55(2):220-3.
62. Sanz-Ortega J, Bryant B, Sanz-Esponera J, Asenjo JA, Saez MC, Torres A, et al. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) is frequent in early stages of non-small cell lung cancer. *Pathol Res. Pract.* 1999; 195(10):677-80.
63. Sanz-Ortega J, Roig F, Al-Mousa MM, Saez MC, Munoz A, Sanz-Esponera J, et al. 17p13 (p53 locus), 5q21 (APC locus) and 9p21 (p16 locus) allelic deletions are frequently found in oral exfoliative cytology cells from smoker patients with non-small-cell lung cancer. *Histol Histopathol.* 2007;22(5):541-5.
64. Loeb L. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991 Jun; 51(12):3075-9.
65. Hussein MR, Wood GS. Building bridges in cancer - Mismatch repair and microsatellite instability. *Am J Dermatopathol.* 2002; 24(1):76-81
66. Sia EA, Kokoska RJ, Dominska M, Greenwell P, Petes TD. Microsatellite instability in yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17(5):2851-8.
67. Aquilina G, Bignami M. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J. Cell. Physiol.* 2001; 187(2):145-54.

68. Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984; 12(10):4127-38.
69. Epplen C, Melmer G, Siedlaczek I, Schwaiger FW, Maueler W, Epplen JT. On the essence of meaningless simple repetitive DNA in eukaryote genomes. *DNA Fingerprinting : State of the Science*. 1993; 67:29-45.
70. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*. 1989 Aug; 17(16):6463-71.
71. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005; 352(18):1851-60.
72. Froudarakis ME, Sourvinos G, Fournel P, Bouros D, Vergnon JM, Spandidos DA, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer. *Chest*. 1998; 113(4):1091-4.
73. Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, Psathakis K, Spandidos DA, Siafakas NM, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(5):1729-33.
74. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, et al. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest*. 1999; 116(1):47-51.
75. Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, Tzanakis N, Tzortzaki EG, Zervou M, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur J Respir Dis*. 2003; 22(6):951-5.

76. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science*. 1991; 253(5015):49-53.
77. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet*. 1997; 15:417-74.
78. Zhou JY, Taguchi T, Siegfried JM, Jhanwar SC, Resau J, Testa JR. Characterization of 9q,15q whole arm translocation derivatives in non small cell lung carcinomas by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 69(1):1-6.
79. Sundaresan V, Heppellparton A, Coleman N, Miozzo M, Sozzi G, Ball R, et al. Somatic genetic changes in lung cancer and precancerous lesions. *Ann Oncol*. 1995; 6:27-32.
80. Kurimoto F, Gemma A, Hosoya Y, Seike M, Takenaka K, Uematsu K, et al. Unchanged frequency of loss of heterozygosity and size of the deleted region at 8p21-23 during metastasis of lung cancer. *Int J Mol. Med*. 2001;8(1):89-93.
81. Tseng R, Chang J, Hsien F, Chang Y, Hsiao C, Chen J, et al. Genomewide loss of heterozygosity and its clinical associations in non small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2005 Nov; 117(2):241-7.
82. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res*. Vol 72. 1998; 72:141-96.

83. Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, Gilliland F, Baylin S, Herman J, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000 Nov;60(21):5954-8.
84. Riese U, Dahse R, Fiedler W, Theuer C, Koscielny S, Ernst G, et al. Tumor suppressor gene p16 (CDKN2A) mutation status and promoter inactivation in head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 1999; 4(1):61-5.
85. Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):97-103.
86. De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1994 Apr;91(8):2882-5.
87. Lee JC, Jong HS, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer.* 1998;21(2):99-103.
88. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: Association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(21):1609-15.
89. Yashima K, Litzky L, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba I, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res.* 1997 Jun;57(12):2373-7.
90. Wistuba, II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous

sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res.* 2000; 60(7):1949-60.

91. Wistuba, II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2604-10.

92. Shay JW, Gazdar AF. Origins of - Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol.* 1997; 50(2):106-9.

93. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001;98(24):13784-9.

94. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98(24):13790-5.

95. Oh JMC, Brichory F, Puravs E, Kuick R, Wood C, Rouillard JM, et al. A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics.* 2001; 1(10):1303-19.

96. Hofmann H, Bartling B, Simm A, Murray R, Aziz N, Hansen G, et al. Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array. *Oncol Rep.* 2006 Sep; 16(3):587-95.

97. Jett JR, Midthun DE. Screening for lung cancer: Current status and future directions - Thomas A. Neff lecture. *Chest.* 2004; 125(5):158S-62S.

98. Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB. Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA*. 2007; 297(9):953-61.
99. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994; 91(21):9871-5.
100. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(7):1634-7.
101. Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res.* 1996; 56(10):2285-8.
102. Katz RL, Zaidi TM, Fernandez RL, Zhang JP, He WG, Acosta C, et al. Automated detection of genetic abnormalities combined with cytology in sputum is a sensitive predictor of lung cancer. *Modern Pathology.* 2008; 21(8):950-60.
103. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med.* 1996; 2(9):1033-5.
104. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61(12):4675-8.

105. Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, Watson JP, Pearson SB, et al. Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *Int J Cancer*. 2001; 91(3):359-65.
106. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6(5):963-8.
107. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003; 63(8):1727-30.
108. Lonergan KM, Chari R, deLeeuw RJ, Shadeo A, Chi B, Tsao MS, et al. Identification of novel lung genes in bronchial epithelium by serial analysis of gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35(6):651-61.
109. Harvey BG, Heguy A, Leopold PL, Carolan BJ, Ferris B, Crystal RG. Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *J Mol Med*. 2007; 85(1):39-53.
110. Boelens MC, van den Berg A, Fehrmann RSN, Geerlings M, de Jong WK, Meerman GJT, et al. Current smoking-specific gene expression signature in normal bronchial epithelium is enhanced in squamous cell lung cancer. *J Pathol*. 2009; 218(2):182-91.
111. Van Leeuwen DM, Van Aagen E, Gottschalk RWH, Vlietinck R, Gielen M, Van Herwijnen MHM, et al. Cigarette smoke-induced differential gene expression in blood cells from monozygotic twin pairs. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3):691-7.

112. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res.* 2001; 61(4):1309-13.
113. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang XM, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101(27):10143-8.
114. Spira A, Beane JE, Shah V, Steiling K, Liu G, Schembri F, et al. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nat Med.* 2007; 13(3):361-6.
115. Boelens MC, Van den Berg A, Fehrmann RSN, Geerlings M, de Jong WK, Meerman GJT, et al. Current smoking-specific gene expression signature in normal bronchial epithelium is enhanced in squamous cell lung cancer. *J Pathol.* 2009; 218(2):182-91.
116. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *Br Med J.* 1997; 315(7114):980-8.
117. Shields PG. Molecular epidemiology of lung cancer. *Ann Oncol.* 1999; 10 Suppl 5:S7-11.
118. Lopez-Encuentra A, Bronchogenic Carcinoma. Comorbidity in operable lung cancer - A multicenter descriptive study on 2992 patients. *Lung Cancer.* 2002; 35(3):263-9.
119. Hernandez J, Heras F, Cordovilla M, Antolin T, Bollo E, Grupo de Estudio CB07-SOCALPAR. Incidencia del carcinoma broncopulmonar en Castilla y León y

en cantabria durante el año 2007. Estudio de la Sociedad Castellano-Leonesa y
Cántabra de Patología Respiratoria (SOCALPAR). Arch Bronconeumol. 2010;
46(1):7-14.