

**TESIS DOCTORAL**

**“VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BCL2 Y KI-67 EN EL  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PULMÓN. ALTERACIONES  
GÉNICAS ASOCIADAS. CORRELACIÓN CON VARIABLES  
ANATOMOCLÍNICAS”**

**BEATRIZ MONTEJO MAILLO**

**A mis padres, por estar siempre**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han prestado su colaboración:

Al Prof. Dr. D. Alberto Gómez Alonso, por tratar de favorecer el desarrollo de este cometido y por su insistencia para que viera la luz.

A la Prf<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Ludeña de la Cruz, por involucrarse completamente en la parte técnica. Por su disposición a resolver interminables problemas infinidad de veces. Por iniciarme y respaldarme en la idea y el estudio, por ayudarme a darle forma y fondo.

Al Dr. D. José M<sup>a</sup> Sayagués Manzano, por el esfuerzo añadido. Por todo lo que he aprendido en cuanto a orden, metodología y crítica. Por enseñarme a leer, escribir e interpretar con rigor. Por transmitirme su ilusión en una realidad esperanzadora donde las técnicas moleculares sean un procedimiento diagnóstico rutinario que nos permita predecir un poco mejor el comportamiento de las neoplasias.

Al Prof. Dr. D. Agustín Bullón Sopelana, por permitirme realizar parte de esta labor investigadora en el Servicio que dirige y poner los medios necesarios para ello a mi entera disposición.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, por su accesibilidad y el excelente trato recibido.

Al Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de Salamanca, por su amabilidad en todo lo que de ellos haya podido necesitar. En especial al Prof. Dr. D. Gonzalo Varela Simó y a D<sup>a</sup>. Natividad Martín Santos, porque siempre he obtenido un “sí” a cambio de nada como respuesta a mis requerimientos y por facilitarme enormemente el trabajo de revisión exhaustiva. La mayoría de los datos clínicos utilizados en este estudio los hemos obtenido de la base de datos de este Servicio.

A D. Manuel Albarrán Fernández, por creer en mí. Por brindarme la oportunidad de disfrutar cada minuto de mi profesión y no poner freno a mi ilusión quirúrgica.

Al Dr. D. Emilio Pérez García, por ser jefe, padre, maestro, colega y amigo. Por definir indiscutiblemente mi pasión por la Cirugía. Por sus valiosos consejos para poder orientar mi futuro profesional por donde deseo.

Al Prof. Dr. D. Luis Emilio Ortega Martín-Corral, el Dr. D. Alfonso Sánchez Rodríguez y la Dra. D<sup>a</sup> Lourdes Hernández Cosido. Por poseer esa solvencia quirúrgica que tanto quiero alcanzar.

Al Dr. D. Manuel José Iglesias Iglesias, el Dr. D. Felipe Parreño Manchado, D. José Luis Revilla Hernández y D. Luis Miguel González Fernández. Todo mi agradecimiento y cariño después de compartir instantes de todo tipo en el contexto de esa “íntima relación” que solamente los cirujanos podemos entender.

A D. José Carlos Garzón Alonso, a D. Francisco Sánchez Montero, a D. José Alfonso Sastre Rincón, a D. José Angel Torres Hernández, al Dr. D. Pablo Benito Duque, a D<sup>a</sup>. Ana de Juan Huelves-Gaspar. Por tanto como me han enseñado y porque me han demostrado su amistad sobradamente.

Al Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca, donde he pasado la mayor parte de mi tiempo los últimos seis años. A la Dra. D<sup>a</sup>. Isabel Silva Benito, por su constante preocupación “materna” por mí. Al Dr. D. José Antonio Alcázar Montero, por cuanto tengo que aprender de él personal y profesionalmente. Al Dr. D. José González-Orús Marcos, por formarme y porque fue mi principal soporte en la Unidad de Patología Mamaria.

Al Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario de Salamanca, por su actitud intachable conmigo, por hacerme sentir siempre como una más, como algo suyo.

A D. Manuel Hernández Bullón, por su infinita paciencia, por su ayuda absolutamente desinteresada, porque estoy en deuda con él.

A D<sup>a</sup>. Ana y D<sup>a</sup>. Carmen Montejo Maillo, por aguantarme, por quererme.

A D. Carlos y D<sup>a</sup>. Raquel Rodríguez Mateos, por estar siempre y desde siempre en todos los momentos importantes de mi vida.

A todos aquellos que hacen cada día que sea mejor cirujano y mejor persona.

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa, corticotropina o corticotrofina  
**ADC:** Adenocarcinoma  
**ADN:** Ácido desoxiribonucleico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**BCL2:** B-cell CLL/lymphoma 2  
**CB:** Carcinoma broncogéno  
**CE:** Carcinoma epidermoide  
**CEE:** Comunidad Económica Europea  
**CGH:** Hibridación genómica comparada  
**CPM:** Cáncer de pulmón microcítico  
**CPNP:** Cáncer de pulmón no microcítico  
**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico  
**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
**FHIT:** Fragile Histidine Triad.  
**iFISH:** Hibridación *in situ* fluorescente en interfase  
**IHQ:** Inmunohistoquímica  
**LRP-DIT:** Receptor lipoproteico  
**LOH:** Pérdida de heterocigosidad  
**MSI:** Inestabilidad de microsatélites  
**MO:** Médula ósea  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**PAAF:** Punción-aspiración con aguja fina  
**PET:** Tomografía por emisión de positrones  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**RMN:** Resonancia magnética nuclear  
**TAC:** Tomografía axial computarizada  
**TSGs:** Genes supresores de tumores  
**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

## **ÍNDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Características generales del cáncer de pulmón.	11
1.2. Alteraciones genéticas en el CPNM.	14
1.2.1. Significado de las alteraciones genéticas de los CPNM.	15
1.2.2. Alteraciones genéticas primarias.	16
1.2.3. Alteraciones genéticas secundarias.	19
1.3. Factores pronósticos en el CPNM.	22
1.4. Métodos de estudio de las alteraciones genéticas de los CPNM.	
1.4.1. Técnicas citogenéticas y moleculares convencionales.	25
1.4.2. Técnicas de hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	26
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	29
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. Pacientes.	33
3.2. Estudio morfológico.	
3.2.1. Matrices de tejido (“tissue microarrays”).	34
3.2.2. Técnica de inmunohistoquímica.	35
3.3. Estudio genético.	37
3.4. Análisis estadístico.	39
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Incidencia de alteraciones numéricas de los cromosomas 14 y 18 en carcinoma epidermoide de pulmón detectadas mediante hibridación <i>in situ</i> fluorescente en interfase.	42
4.2. Estudios de expresión de BCL2 y KI-67/MIB-1 en carcinoma epidermoide de pulmón.	47
4.3. Implicaciones de las alteraciones genéticas detectadas en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo de los carcinomas epidermoides de pulmón.	48

<b>V. DISCUSIÓN</b>	
5.1. Incidencia de alteraciones numéricas de los cromosomas 14 y 18 en carcinoma epidermoide de pulmón detectadas mediante iFISH.	55
5.2. Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en los CPNM.	56
5.3. Estudios de expresión de BCL2 y KI-67/MIB-1 en carcinoma epidermoide de pulmón. Correlación con otras variables anatomo-clínicas.	59
5.4. Impacto de las alteraciones cromosómicas y del resto de variables anatomo-clínicas en la evolución de la enfermedad.	64
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	67
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	71

## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento generalmente maligno, suele derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo.

El cáncer de pulmón supone la causa principal de muerte por cáncer en el varón. Su incidencia en la mujer es alarmante, en quienes se ha comprobado un aumento importante tanto en incidencia como en mortalidad por esta neoplasia, como consecuencia de la incorporación de la mujer al hábito tabáquico. Así, se prevee que en los próximos años llegue a superar en ambos parámetros (incidencia y mortalidad) al cáncer de mama (1). En España, como en el resto de países, tiene una incidencia creciente y mal pronóstico (2-5). Se estiman 900.000 muertes anuales en todo el mundo. Hernández e Izargaza en el año 2002 estimaron que para el año 2020 ocuparía el cuarto lugar entre las causas de muerte en nuestra población (6). No obstante, existe una marcada variación geográfica por ser una enfermedad con factores etiológicos predominantemente ambientales. Según la Asociación Española contra el Cáncer (AECC), en el año 2009 la incidencia del cáncer de pulmón en España fue de 52 casos por cada 100.000 habitantes mientras que según Mugüenza en el año 1994 en los países occidentales osciló entre 20 y 40 casos nuevos por cada 100.000 habitantes/año (7). En mujeres es la segunda causa de muerte por cáncer -19% de todas las muertes por tumores malignos- (7-9), por detrás de las neoplasias de mama. En EEUU, constituye la primera causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres, con 180.000 casos en el año 1994. En Norte América el número de muertes anuales por cáncer de pulmón es mayor que el ocasionado por el conjunto de neoplasias de mama, próstata y colon (4;10).

En las últimas dos décadas se ha producido una importante progresión de los conocimientos sobre la etiología, epidemiología y prevención de esta neoplasia. Por el contrario, apenas se ha conseguido una mejoría en la expectativa de supervivencia, mantenida en torno al 5-10% a los 5 años (7). En la actualidad la única medida realmente eficaz para disminuir la incidencia y mortalidad por este tumor es no iniciarse (o en su defecto, abandonar) en el hábito tabáquico. El tabaco es responsable de la **etiología** en aproximadamente un 90% de los CB (11), incluyendo alrededor de un 25%

de los que tienen lugar en fumadores pasivos (12-14). Sin embargo, no en todos los casos de cáncer de pulmón existe un agente etiológico condicionante y sólo el 10% de los fumadores desarrollará un cáncer de pulmón a lo largo de su vida. En los ex-fumadores, dicho riesgo disminuye a medida que aumenta el tiempo de abstinencia del tabaco; así, a los 10 años de dejar de fumar, el riesgo de cáncer es casi igual al de los no fumadores (13;15), aunque no parece llegar a igualarse nunca.

En este sentido, se han descrito algunos factores ocupacionales como carcinógenos del ambiente laboral. La exposición al asbesto, arsénico (16;17), níquel (18;19), cromo (20), éteres clorometílicos (21), gas mostaza (22) y radiaciones ionizantes (21-23) se han asociado con el cáncer de pulmón de forma independiente del hábito de fumar, o ejerciendo un efecto aditivo con el tabaco.

Así mismo, son marcadores de susceptibilidad genética conocidos (heredados, de predominio poblacional o de presentación esporádica) las mutaciones del gen *P53*, la elevada actividad de la 4-hidroxiladora de la debrisoquina del citocromo P-450, el bajo nivel de actividad de la enzima glutatión transferasa, la menor susceptibilidad en personas con grupo sanguíneo 0 y HLA-DR7 y mayor riesgo en portadores del gen del retinoblastoma (*RBI*), los alelos raros de *H-RAS 1* y las alteraciones asociadas a inestabilidad genética, objeto de estudio del presente trabajo. Por otro lado, es frecuente la asociación de cáncer de pulmón como segundo primario en pacientes con tumores previamente “curados”, del área ORL (sobre todo cáncer epidermoide de laringe, que asocia cáncer de pulmón en el 26% de los casos) y otras enfermedades no tumorales como la EPOC (riesgo del 8,8% a los 10 años) y el VIH.

En cuanto a la **anatomía patológica**, la nomenclatura de los tumores pulmonares malignos epiteliales más utilizada es la clasificación de la OMS (24). El carcinoma epidermoide es el carcinoma más habitual, constituyendo el 35-60% de las resecciones quirúrgicas por cáncer de pulmón y con un claro predominio en varones. Su localización más común es la hiliar, suele alcanzar un gran tamaño y es el tipo histológico que más frecuentemente sufre cavitación (25). Además, el pulmón es uno de los pocos órganos en el que los tumores primarios son más frecuentes que los metastásicos (a pesar de que las metástasis de tumores de otras localizaciones también son muy frecuentes). Más del 90% de las neoplasias pulmonares primarias son malignas.

La **clínica** del CB es muy variada siendo habitualmente asintomático o presentándose con síntomas generales inespecíficos, lo que dificulta el diagnóstico precoz de este tipo de tumores. También puede dar síntomas directos derivados de su localización (tos y expectoración hemoptoica en los tumores centrales, atelectasia en aquellos de gran tamaño con/sin neumonitis obstructiva) o por invasión de estructuras adyacentes o adenopatías regionales. En estos casos puede producir obstrucción traqueal, disfagia, disfonía, parálisis del nervio frénico, síndrome de vena cava superior... Las metástasis hematógenas son muy frecuentes, sobre todo en cerebro, hígado, hueso, médula ósea y glándulas suprarrenales. Finalmente, puede manifestarse por síndromes paraneoplásicos y con producción hormonal: todos los tipos tumorales pueden producir ACTH y acropaquias, y el epidermoide se relaciona más frecuentemente con hipercalcemia.

Para el **diagnóstico y estudio de extensión**, cuando existe sospecha de cáncer de pulmón en un paciente, es fundamental una confirmación citológica o histológica del proceso, así como una correcta estadificación de la enfermedad. Sólo así se podrá dar una correcta información pronóstica y realizar un buen enfoque terapéutico. Para ello además de anamnesis y exploración física, las exploraciones complementarias son fundamentales e incluyen analítica general, citología del esputo, radiografía de tórax, TAC, RMN, gammagrafía, PET, PAAF, fibrobroncoscopia, mediastinoscopia y mediastinotomía, toracoscopia videoasistida y toracotomía.

En el momento del diagnóstico y respecto al **tratamiento**, el carcinoma epidermoide de pulmón se puede dividir en tres grupos:

A). Enfermedad potencialmente resecable, constituido por los estadios I y II. Es el de mejor pronóstico, dependiendo además de otros factores (del huésped y del tumor).

B). El segundo grupo está formado por la enfermedad avanzada localmente (T3, T4) o regionalmente (N2, N3). Este grupo puede tener una historia natural diversa. En estos casos el tratamiento de elección puede ser la cirugía, la cirugía precedida de quimioterapia neoadyuvante o la combinación de quimioterapia con radioterapia.

C). El tercer grupo corresponde a la enfermedad avanzada o metastásica. En este estadio de enfermedad la quimioterapia y la radioterapia tienen fines paliativos.

Actualmente hay pacientes que se benefician de tratamientos específicos ante determinados factores de crecimiento como el EGF, tratamientos basados en el conocimiento de los mecanismos intracelulares que se encuentran activados en el CP (26).

Por otra parte, constantemente aparecen en la literatura nuevas aportaciones acerca de los marcadores biológicos relacionados con el comportamiento clínico tumoral, y continúan identificándose las respuestas de los mismos a los distintos regímenes terapéuticos. Todo ello tiene un gran interés, que radica en incorporar estos marcadores a la práctica rutinaria, lo que conseguiría una intervención terapéutica efectiva, y por tanto, mejorar el pronóstico de estos pacientes.

## **1.2.ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL CPNM**

Hoy se reconoce que la transformación neoplásica constituye el resultado de una cascada de eventos moleculares que conllevan una pérdida, a nivel celular, del control normal sobre la proliferación, la diferenciación y/o la supervivencia celular, así como de las interacciones normales de la célula alterada con el micromedioambiente en el que se localiza; en este proceso, las alteraciones genéticas juegan un papel clave. En las dos últimas décadas, ha aumentado de forma notable el número de estudios encaminados al análisis de las características citogenéticas de los CPNM (27-41). En la mayoría de estos estudios, para la identificación de las alteraciones genéticas de los CPNM se han empleado técnicas convencionales de citogenética (27-34;36). No obstante, al principio de la década de los 90, Fountain J.W. y cols. (42) introdujeron las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre núcleos interfásicos para el análisis de las alteraciones numéricas de cromosomas en CPNM, extendiéndose de forma notable su uso a lo largo de los últimos años (37;39;40;43;44).

En su conjunto, los estudios citogenéticos iniciales sobre CPNM mostraron de forma inequívoca que la alteración cromosómica más frecuente en estos tumores es la pérdida (monosomía) del cromosoma 3 o la delección del brazo corto de este cromosoma (3p<sup>-</sup>) -(29;45)-. Estos hallazgos han sido confirmados más recientemente por estudios de iFISH y de análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) para el cromosoma 3 que han mostrado la existencia, en una elevada proporción de CPNM, de anomalías estructurales que afectan tanto a regiones centroméricas (46;47) como a fragmentos localizados

teloméricamente a 3p21 (donde se localizan genes reparadores de ADN, *hMLH1* y *hMSH2*) (48;49) asociadas a la pérdida de una copia del cromosoma 3 o de su brazo corto. En su conjunto, estos resultados indicarían que algunos genes localizados en el brazo corto del cromosoma 3 podrían estar involucrados en las primeras etapas del proceso de transformación neoplásica en los CPNM. Estudios posteriores demostraron que, además de las alteraciones del cromosoma 3, con frecuencia se observa la presencia de cariotipos complejos definidos por la coexistencia de alteraciones numéricas y/o estructurales de otros cromosomas, asociados o no a monosomía 3p<sup>-</sup>. Estas alteraciones incluyen principalmente pérdidas del cromosoma 2q (50;51), 5q (51), 8p (52;53) y 11q (54) junto con delección o monosomía de los cromosomas 14 (51) y 18 (50;55;56).

Por el contrario, las alteraciones numéricas asociadas a ganancias cromosómicas son menos frecuentes y afectan preferentemente a los cromosomas 1q, 5p (57;58), 6 (58;59), 7 (58;60;61) y 8q (58;62-64). Estos hallazgos indican que, como ocurre en otros tipos de tumores, los CPNM representan un grupo de neoplasias citogenéticamente heterogéneas. Sin embargo, un análisis exhaustivo de la literatura, muestra variabilidad en relación con la incidencia exacta de cada anomalía genética concreta. Así, por ejemplo, la incidencia de monosomía 3/3p<sup>-</sup> oscila en la literatura entre el 20% y 96%, dependiendo de las series analizadas (51;65-67). Aunque no se conocen con precisión las causas de esta variabilidad, se cree que pueden estar relacionadas con cuestiones metodológicas como el tipo de técnica citogenética utilizada, los criterios empleados para definir la existencia de anomalías del cromosoma 3 y el pequeño número de pacientes analizados en una importante proporción de estos trabajos. Más adelante se discuten de forma más precisa, las ventajas y limitaciones de las distintas técnicas utilizadas habitualmente para el estudio de las anomalías citogenéticas en CPNM.

### **1.2.1. Significado de las alteraciones genéticas de los CPNM.**

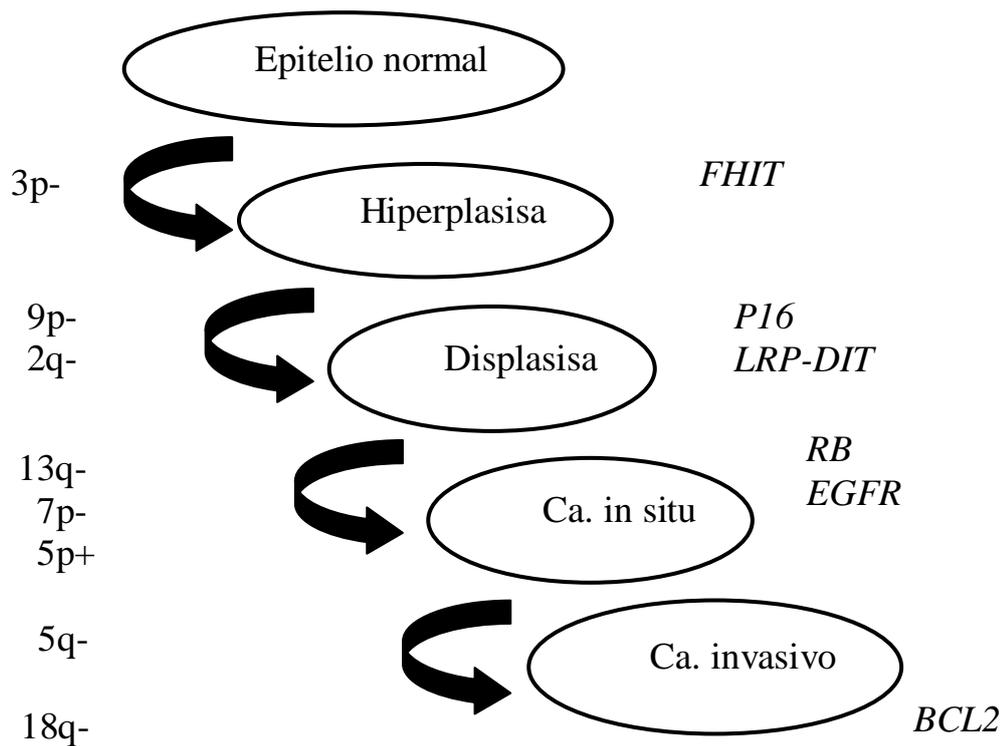
El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas (68). Además, hoy sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas aporta información de gran valor diagnóstico y pronóstico, tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos (69;70). En general, se piensa que la detección de varias alteraciones genéticas en una misma célula neoplásica podría estar relacionada

con un mayor tiempo de evolución desde la transformación tumoral a la aparición de las manifestaciones clínicas, lo que facilitaría la evolución clonal del tumor (71;72). Así, una neoplasia en la que se detecta un número reducido de alteraciones genéticas de tipo primario presentaría un grado de malignidad inferior al de aquellos tumores en los que, sobre estas alteraciones genéticas, se han acumulado alteraciones secundarias, especialmente aquellas que se asocian con una mayor progresión clínica y biológica de la enfermedad. Mientras que la identificación de las alteraciones primarias es fundamental a la hora de conocer los mecanismos implicados en el proceso de transformación neoplásica, el estudio de las alteraciones secundarias se reviste de especial interés a la hora de determinar el grado de agresividad y malignidad de un tumor (72).

La existencia de cambios citogenéticos relacionados directamente con el comportamiento biológico de los CPNM es un dato contrastado en la literatura (51;58). Fruto de estos estudios, se han propuesto vías hipotéticas de evolución clonal en los CPNM, en las que se ha establecido una secuencia hipotética de alteraciones genéticas y anomalías cromosómicas que ocurrirían y se acumularían desde el epitelio normal a las lesiones preneoplásicas y a las lesiones pulmonares invasivas.

### **1.2.2. Alteraciones genéticas primarias**

En la Figura 1 se representa de forma esquemática un modelo hipotético de la progresión desde los estadios tempranos hasta las lesiones más avanzadas de acuerdo con la secuencia de alteraciones genéticas que hipotéticamente se acumularían en la célula neoplásica. En dicho modelo, como se ha mostrado en otro tipo de tumores (73;74) se propone una vía de carcinogénesis relacionada con el fallo de los sistemas de control de la replicación del ADN, lo que conduciría a una inestabilidad genómica intrínseca, que a su vez favorecería el acumulo de mutaciones y la transformación neoplásica.



**Figura 1:** Modelo hipotético de los cambios genéticos asociados a la transformación neoplásica y a la progresión maligna que ocurriría en los CPNM.

En este sentido, la alteración genética más frecuentemente encontrada en CPNM consiste en deleciones en el brazo corto del cromosoma 3, presentes entre el 40% (75) y el 90% de los casos (65). De acuerdo con ello, los estudios citogenéticos señalan que la pérdida parcial o total del cromosoma 3 es la alteración cromosómica más frecuentemente encontrada en los CPNM y podría constituir el primer o uno de los primeros cambios que ocurren en el desarrollo de estos tumores (51); esta observación ha sido corroborada empleando marcadores polimórficos mediante la comprobación de la existencia de LOH a nivel de 3p en alrededor de 37% a 100% de los CPNM (51;67;76-78). Además, estos estudios muestran que deleciones de las regiones cromosómicas 3p21, 3p22-24 y 3p25 son más frecuentes en lesiones preneoplásicas mientras que pérdidas a nivel de 3p12, 3p14.2 y 3p14-21 son más habituales en lesiones avanzadas. Desde el punto de vista patogénico, merece destacar que la mayor parte de

las deleciones a nivel de 3p están asociadas a metilaciones del promotor del gen supresor *FHIT*, localizado en 3p14.2. Aunque el mecanismo exacto por el que la proteína FHIT ejerce su actividad reguladora del crecimiento tumoral está aún por dilucidar, estudios recientes han demostrado que dicha proteína juega un papel importante en el control de la proliferación celular, reparando el ADN tumoral aberrante e impidiendo su replicación (79). Además, se han descrito transcritos anómalos de este gen en un 40% de los CPNM (80). La pérdida de heterocigosidad (LOH) es más frecuente en fumadores que no fumadores, sugiriendo que este gen es una diana para las sustancias carcinogénicas del tabaco (81). Se ha descrito alteración de este gen en el epitelio morfológicamente normal de fumadores y mediante iFISH, Caballero y cols. describieron la pérdida de dicho gen en el epitelio normal de pacientes con tumores primarios (82). Su implicación en los estadios iniciales del desarrollo del tumor se confirma con la descripción de deleciones en lesiones preneoplásicas (83). La frecuencia de alteraciones en *FHIT* varía en los subtipos histológicos más comunes de los CPNM. Así, se ha sugerido que el origen genético de los adenocarcinomas es en gran medida independiente de las alteraciones en este gen (puesto que en más de la mitad de este tipo de tumores la expresión de la proteína FHIT es normal), a diferencia de lo que ocurriría en los carcinomas epidermoides (con la expresión de dicha proteína anormalmente reducida en la mayoría de ellos).

Además de *FHIT*, se ha identificado la presencia de otros genes supresores de tumor en el brazo corto del cromosoma 3. Así, se han descrito deleciones homocigóticas en una región de 120kb en 3p21.3 que afectan a los genes *CACNA2D2*, *101F6*, *NPRL2*, *BLU*, *FUS1*, *HYAL2*, *HYAL1*, *SEMA3B*, *SEMA3F* y *RBM5/H37*, entre otros (84;85). Sin embargo, la tasa de mutación para estos genes es muy baja (menos de 5% de los casos) en la mayoría de los estudios, sugiriendo que, en caso de ser supresores tumorales, la vía de inactivación no es la mutación genómica. Uno de los mecanismos de inactivación de genes supresores frecuente en pulmón es la hipermetilación del promotor, descrita en genes como *RASSF1A* (también en 3p21) (86), *RAR $\beta$* , *TIMP-3*, *CDKN2A/p16*, *MGMT*, *DAPK*, *ECAD*, *GSTP1* y también *FHIT* (81). Además, las regiones cromosómicas 3p21.3-22 y 2p16.3-22 contienen los genes reparadores de ADN, *hMLH1* y *hMLH2*, respectivamente. Se han descrito anomalías en el gen *hMLH2* en el 78% de los pacientes con CPNM, la mayoría de estas anomalías corresponden a procesos de hipermetilación del promotor del gen (87).

### 1.2.3. Alteraciones genéticas secundarias

La progresión maligna en los CPNM viene asociada a la aparición de cambios genéticos secundarios que incluyen pérdidas adicionales de material genético de uno o más cromosomas y diferentes reordenamientos estructurales (53;88-91). De todos los cambios secundarios encontrados en el genoma de la célula tumoral en los CPNM, la delección del brazo corto del cromosoma 9 es la anomalía más frecuente. En su conjunto, la delección del cromosoma 9p representa la segunda anomalía cromosómica más frecuentemente encontrada en los CPNM y su frecuencia aumenta de forma progresiva desde lesiones preneoplásicas a lesiones más avanzadas (87). Estos hallazgos proporcionan una evidencia indirecta de la posible relevancia de las pérdidas de información genética a nivel del cromosoma 9p en la progresión de la enfermedad. En esta región cromosómica se localizan los genes *P15* y *P16*, localizados a nivel de 9p21. El gen *P16*, actúa sobre el ciclo celular mediante la inhibición de quinasas dependientes de ciclinas, bloqueando el paso de la célula de la fase G1 a S. Todos los estudios coinciden en que hasta un 40% de los CPNM en estadios precoces tienen una ausencia de expresión de *P16* (92;93). Por este motivo, se postula que la ausencia de expresión de *P16* es un factor pronóstico adverso en CPNM (94;95).

Desde el punto de vista citogenético, otra anomalía que aparece en estadios tempranos del cáncer de pulmón es LOH a nivel de 2q (96). Tomizawa y cols. encontraron que el 22% de la serie estudiada mostraba pérdidas alélicas de este cromosoma en un total de 108 pacientes con CPNM (97). En esta región se aloja el gen *LRP-DIT*.

Mutaciones en el gen *BRCA2*, localizado en 13q12.3 han sido descritas hasta en el 70% de los CPNM estudiados por Gorgoulis y cols. (98) sobre un total de 63 pacientes. Esta lesión génica fue encontrada sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad. También anomalías en el cromosoma 7 ocurren en etapas tempranas del desarrollo del cáncer de pulmón y su aneuploidía se ha demostrado en el 100% de los tumores primarios y en un 80% de lesiones premalignas (99); en 7p12 se localizan los genes *EGFR* e *IL-6*, encontrándolos Kang y sus colaboradores sobre-expresados en 65% de los CPNM analizados (43).

Otras alteraciones genéticas secundarias descritas en los CPNM e implicadas en la progresión tumoral, incluyen alteraciones a nivel del cromosoma 5p. Así, se ha descrito que la frecuencia de ganancias de 5p15.2 y 5p15.3 en los CPNM se relaciona

con el grado tumoral, detectándose en un 73% y 78%, respectivamente (43;100) en pacientes con CPNM en estadio I, biomarcador que podría utilizarse para el diagnóstico precoz de estas neoplasias. Por el contrario, deleciones en 5q21, que alberga los genes supresores de tumor *MMC* y *APC*, fueron significativamente más frecuentes en el cáncer invasivo (70% de los casos) que en el carcinoma *in situ* (40%), displasias (33%) e hiperplasias/metaplasias (11%) (90).

Otras alteraciones cromosómicas descritas, en un estadio clínico avanzado, con menor frecuencia en los CPNM, incluyen pérdidas a nivel de los cromosomas 11, 17q, 18q y 22q (101) y ganancias de 6p y 8q (43;62;63).

Múltiples trabajos han tenido como objeto analizar las alteraciones en los cromosomas 14 (44;102-106) y 18 (51;107-112) tanto en el cáncer de pulmón como en otro tipo de tumores (107;113;114). Las deleciones en 18q (18q-) se han descrito en los cánceres de páncreas, colon, esófago, estómago, próstata y neuroblastomas (115-117). Especial interés ha despertado la región 18q21, donde se localiza *BCL2*, por contener la secuencia de varios genes implicados en la patogenia de diferentes tipos de tumores (109;116;118). Así, el 75% de los cánceres colorrectales muestran LOH en 18q21 (119;120) región en la que se localizan varios genes supresores próximos a *BCL2* implicados en el pronóstico de este tipo de tumores (121-123). Sin embargo, la frecuencia de mutaciones en algunos de esos genes (*DCC*, *DPC4/SMAD4*) referida por algunos grupos es menor que la LOH, por lo que su papel en la carcinogénesis del cáncer de colon resulta controvertido (124;125).

En el cáncer de páncreas, *DPC4*, localizado en 18q21 como he señalado previamente, ha sido propuesto como otro probable gen supresor cuya inactivación podría estar implicada en la génesis de estos tumores (126). También el gen *MASPIN*, codificado junto a otros genes (*SCCA1/2* y *HURPIN*) en la región 18q21.3 se ha relacionado con la evolución de algunos tumores (109). Así, algunos autores han observado que la alteración en la regulación del mismo parece ocurrir durante el desarrollo del cáncer de mama (127) y además, que la ausencia de su expresión se correlacionaba con una mayor tendencia a la metastatización del tumor primario, tanto en el cáncer de mama (128) como en otros tumores (129). Sin embargo, para otros autores la expresión de *MASPIN* es un factor pronóstico negativo tanto del cancer de mama (130) como de ovario (131) y en los tumores de próstata parece desempeñar un papel crítico en la transición de lesión premaligna a carcinoma invasivo (132).

En carcinomas de cabeza y cuello las alteraciones en 18q21 se han propuesto como características genéticas que confieren una resistencia adquirida a ciertos quimioterápicos como la vinblastina (113). Así, la expresión aberrante de *BCL2* se ha considerado uno de los mecanismos que explicaría la resistencia de las células tumorales a algunos quimioterápicos (133-135). La metilación del DNA sería la alteración epigenética más común en el genoma tumoral y podría condicionar un defecto en la transcripción de genes supresores de tumores. Este modelo de metilación específica está involucrado en el desarrollo de resistencia terapéutica por parte de las células tumorales (136).

Estudios de LOH y de iFISH han puesto de manifiesto la presencia de pérdida del gen *BCL2*, localizado en el brazo largo del cromosoma 18 en alrededor de dos terceras partes de los CPNM (50;51;76;108;111;112). En esta misma línea, se encuentran los resultados de diferentes autores, quienes mediante estudios inmunohistoquímicos encontraron expresión del gen *BCL2* en un 20-30% de los CPNM (137;138). Por el contrario, otros estudios no evidenciaron diferencia en la expresión del gen *BCL2* entre el tejido tumoral y tejido sano del paciente con CPNM (109). Sin embargo, estos autores identificaron la sobre-expresión del gen *MASPIN*, localizado en 18q21.3, en el 74% de los CPNM, asumiendo el rol de gen supresor. Además, concretamente en carcinomas epidermoides, encontraron una mayor expresión de este gen con respecto a otras variantes histológicas como el adenocarcinoma (109). No obstante, actualmente siguen sin conocerse los mecanismos implicados en la inactivación del gen *BCL2* en estos tumores. En este sentido, Shiseki M. y cols. propusieron que durante la progresión del CPNM el primer evento que ocurriría sería la pérdida de 18q y posteriormente ocurriría la inactivación del gen *BCL2* en el alelo restante mediante mecanismos de metilación (51).

Además de *BCL2*, se ha identificado la presencia de otros genes supresores de tumor en el brazo largo del cromosoma 18. Por un lado, ello explicaría la mayor frecuencia de LOH observada en esta región cromosómica respecto a la de las mutaciones y/o metilaciones del gen *BCL2*, y por otra parte, la ocurrencia en algunos tumores de deleciones intersticiales en el cromosoma 18q, que no afectan al gen *BCL2* (111). En cualquier caso, se han identificado varios genes supresores de tumor en el brazo largo del cromosoma 18. Todos ellos se localizan a nivel de 18q21, próximos al gen *BCL2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC* (110;112) y *DPC4* (110;111). Todos ellos constiuyen genes supresores y las mutaciones de *DCC* han sido las más frecuentemente

descritas en los CPNM (110). No obstante, queda por conocer el papel específico que cada uno de estos genes pueda tener en el origen y progresión de los CPNM (110).

Por otro lado, el cromosoma 14 en cáncer de pulmón, ha sido objeto de múltiples investigaciones (44;102-106), con el fin de identificar las alteraciones genéticas involucradas en la carcinogénesis de los CPNM. En este sentido, diferentes autores han estudiado la LOH a nivel de 14q11-12(102;106), 14q13-21 y 14q24-31(44;104-106) así como anomalías numéricas del cromosoma 14 en el 32% de los CPNM analizados (106). Este último hallazgo resultó concordante con otros trabajos (46;139-141), que publicaron una frecuencia de dichas anomalías entre el 23-56%, a diferencia de Fong K.M. y cols. (142), quienes sólo evidenciaron estas alteraciones en el 6,5% de los casos estudiados.

### **1.3. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CPNM**

En las últimas décadas se han buscado factores pronósticos que permitan identificar en el momento del diagnóstico, aquellos pacientes que presentan un elevado riesgo de recaída. De todas las características del tumor, el estadio clínico constituye el factor pronóstico de mayor valor predictivo en relación con la supervivencia libre de enfermedad. Así, la incidencia de supervivencia a los 5 años en pacientes con CPNM que se encuentran en estadio I oscila entre el 60-70% (143) mientras que pacientes en estadio IIIA quirúrgicamente resecables, la supervivencia a los cinco años se reduce a una cuarta parte de pacientes operados (144).

A parte del estadio clínico del tumor, pocos rasgos de la enfermedad han mostrado ser útiles a la hora de predecir el pronóstico de los CPNM. Trabajos preliminares han encontrado una asociación significativa entre la ploidía de ADN y el pronóstico de CPNM (28;58;145). Sin embargo, esta asociación no siempre se ha podido confirmar (58;87), y parece depender más que de la cantidad global de ADN de la célula tumoral, de alteraciones genéticas concretas presentes en la misma. En este sentido, pese a la gran cantidad y heterogeneidad de las alteraciones genéticas descritas hasta la fecha en los CPNM, continúan siendo pocos los estudios en los que se demuestra de forma fehaciente su asociación con el pronóstico de la enfermedad. De entre las anomalías genéticas que se han asociado a una menor supervivencia, merece destacar anomalías en 3p (146), deleciones en 5q (145) y amplificaciones a nivel de 6p y 8q (63). Recientemente, Kang y cols. encontraron la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre el estadio del tumor y la presencia de ganancias a

nivel de las regiones cromosómicas 6p11.1 y 8q24.12, encontrándose amplificadas ambas regiones en los estadios más avanzados de la enfermedad (carcinoma *in situ* e invasivo) por lo que el estudio de estas regiones cromosómicas se ha propuesto como herramienta de detección de los CPNM en progresión (58). Tomizawa y cols. (97) demostraron que deleciones y/o mutaciones puntuales en 9p21, presentes entre un 10-40% de los tumores (147), implicaban una mayor agresividad clínica en los CPNM, en varones fumadores que se encontraban en un estadio preneoplásico.

En esta misma línea Shiseki M. y cols. (51) clasificaron los CPNM en dos patrones citogenéticos, mostrando claramente que el grupo de CPNM que presentaba mayor índice de tumores recurrentes asociados a procesos metastásicos era aquel que mostraba alterados los cromosomas 2q, 18q y 22q. Este hallazgo, también ha sido demostrado incluso en pacientes en estadio I después de una resección total del tumor primario (148), sugiriendo que estas alteraciones cromosómicas estaban involucradas en las metástasis que aparecían de forma temprana en la enfermedad. Sin embargo, respecto al gen *BCL2*, la literatura muestra gran heterogeneidad en los resultados: mientras que algunos autores han observado que deleciones a nivel de 18q son frecuentes en CPNM avanzados (>60% de los casos) (51;76;97) para otros (145) son poco habituales (14%) y no guardan relación con el estadio de la enfermedad. En otros trabajos las pérdidas alélicas en 18q<sup>-</sup> constituyen un evento tardío en la progresión de los CPNM y condiciona una mayor agresividad de la enfermedad (51;112). No obstante, anomalías en el gen *BCL2* han sido descritas en una gran variedad de neoplasias como el cáncer de mama (149;150), tiroides (151) y próstata (152). Así, se ha encontrado una fuerte asociación entre niveles de expresión del gen *BCL2* y el grado de diferenciación tumoral, lo cual podría suponer una ventaja en el proceso de la transformación neoplásica (153). En cáncer de mama la expresión del gen *BCL2* se ha asociado con tumores bien diferenciados, con la expresión de receptores hormonales y con la sensibilidad a la terapia endocrina; así mismo, su expresión se ha correlacionado con acontecimientos clínico-patológicos favorables (149;154-158).

En CPNM también son numerosas las referencias bibliográficas acerca de la proteína BCL2 y su impacto pronóstico (159-164). A pesar de su marcada controversia, en la mayoría de los trabajos publicados se comparte que la proteína BCL2 muestra una mayor expresión en los CPNM y concretamente, en la variedad histológica epidermoide (3;137;165-169) siendo minoría los trabajos en que dicha expresión ha resultado mayor en adenocarcinomas (170). Por el contrario, algunos estudios han demostrado que la

expresión de BCL2 es más acentuada en el carcinoma microcítico de pulmón que en el no microcítico, existiendo estudios que demuestran una alta expresión de la proteína BCL2 en el 75-95% de estos tumores (171). Este hallazgo puede resultar paradójico si consideramos que el carcinoma microcítico responde mejor al tratamiento quimioterápico que el CPNM (172). Por otra parte, la expresión de BCL2 se ha correlacionado con otras características histológicas de la enfermedad, principalmente con lesiones bien diferenciadas (165) y con un mayor grado de displasia (173;174).

En relación con la supervivencia de los pacientes, los trabajos publicados hasta el momento actual muestran resultados controvertidos y contradictorios (143;168;174-179). No obstante (159;178-180;180-184), de forma general (173) o estratificando a los pacientes según la edad y/o el estadio clínico, la sobre-expresión de BCL2 ha demostrado un impacto favorable en la supervivencia. Los subgrupos de pacientes con el diagnóstico de CPNM y que expresan BCL2 mayores de 60 años (137), en estadios tempranos (165-168;179;184;185) o avanzados (186) tendrían mejor pronóstico que los que no expresan la proteína; esta observación ha sido corroborada por otros autores, los cuales han demostrado que la pérdida de expresión de BCL2 se asocia al desarrollo de metástasis y en definitiva, a una supervivencia más corta (153).

Con frecuencia la estimación de la actividad proliferativa del tumor se ha analizado mediante el uso de diferentes anticuerpos monoclonales de los que KI-67 ha sido el más empleado en CPNM. Así, en los CPNM, niveles elevados de KI-67 se han correlacionado con factores pronósticos adversos, con un mayor riesgo de recaída en pacientes en estadio clínico localizado -IA y IB- y un mayor riesgo de desarrollar metástasis cerebrales (169;187). No obstante, en los diferentes estudios realizados se observa una gran variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes centros y en distintos grupos de individuos (143;176;179;188-191); esta gran heterogeneidad podría ser debida a que en los CPNM, la actividad proliferativa no está distribuida de forma homogénea en las distintas zonas del tumor. A pesar de ello, se acepta que índices de positividad para KI-67 superior al 20% de las células tumorales estarían asociados a estadios clínicos más agresivos. En este sentido, Soini Y. y cols (192) encontraron que la expresión de KI-67 aumenta de forma exponencial a medida que lo hace la severidad de la lesión, desde el epitelio normal hasta el carcinoma invasivo. Desde el punto de vista histológico, Poleri C. y cols. (169) encontraron que los carcinomas epidermoides (con respecto a los adenocarcinomas) presentaban un índice de proliferación más alto que los adenocarcinomas, hallazgo corroborado por otros autores (193).

## **1.4.MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DE LOS CPNM**

En la actualidad, disponemos de una amplia batería metodológica para el análisis de las alteraciones genéticas de los tumores pulmonares que van desde las técnicas convencionales de citogenética, al análisis de ácidos nucleicos mediante biología molecular.

### **1.4.1. Técnicas citogenéticas y moleculares convencionales.**

La mayoría de los estudios disponibles en la actualidad y encaminados al análisis de las características citogenéticas y moleculares de los CPNM han empleado métodos citogenéticos y moleculares convencionales (27-34;36). Pese a sus ventajas, ambas metodologías siguen presentando algunos inconvenientes. Por un lado, los métodos citogenéticos convencionales aunque permiten una visión global de las alteraciones citogenéticas presentes en una misma célula o un grupo de células tumorales, presentan algunos problemas relacionados con la necesidad de obtener metafases y la posibilidad de que ocurra una selección clonal en cultivo. Así mismo, otra limitación de esta metodología radica en el hecho de que únicamente permite el análisis de metafases, representando estas habitualmente una proporción minoritaria de la celularidad global. Además, se trata de una técnica muy laboriosa en la que existe un importante componente subjetivo a la hora de interpretar dichas metafases que, con frecuencia, muestran una calidad morfológica deficiente. Por otra parte, las técnicas de biología molecular requieren de la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de su localización natural, la célula; por este motivo, resulta difícil si no del todo imposible, la obtención de información de forma específica sobre células o poblaciones celulares concretas presentes en una muestra biológica heterogénea, lo que representa una importante limitación a la hora de profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad clonal a nivel intratumoral.

Ante esta situación, el estudio de las alteraciones genéticas presentes en los carcinomas epidermoides de pulmón requiere de otras aproximaciones metodológicas, además de las técnicas de citogenética y biología molecular convencionales, que permitan realizar análisis dirigidos a la detección de alteraciones genéticas específicas sobre células individuales, capaces de evaluar globalmente la celularidad tumoral y que eviten el cultivo de células tumorales y la necesidad de obtener metafases.

<b>Técnica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
<i>Citogenética convencional</i>	<p>Aporta información sobre todos los cromosomas</p> <p>Bajo coste en reactivos</p>	<p>Requiere células en división del clon neoplásico</p> <p>Interpretación subjetiva (requiere experto)</p> <p>Análisis de una pequeña proporción todas las células (metafasas)</p> <p>Baja sensibilidad.</p> <p>Selección clonal.</p>
<i>FISH</i>	<p>Aplicable tanto en metafase como en interfase.</p> <p>Permite el análisis de todas las células del tumor.</p> <p>Elevada sensibilidad.</p> <p>Elevada especificidad.</p>	<p>Sólo aporta información sobre la región del genoma analizada</p> <p>Coste moderado en reactivos</p>

**Tabla 1:** Análisis comparativo de las principales ventajas y limitaciones de las técnicas de citogenética convencional y FISH.

#### **1.4.2. Técnicas de hibridación *in situ* fluorescente.**

Las técnicas de FISH permiten la detección y localización de secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido, conservando su estructura morfológica. El método se basa en el emparejamiento específico (hibridación) de dos secuencias de ácidos nucleicos complementarias, en el que una sonda marcada forma un híbrido con la secuencia de ADN diana frente a la que va dirigida (194). Dicho híbrido puede visualizarse tras un revelado inmunológico. Para ello, una vez obtenido el material celular es necesario disponer de sondas marcadas frente a la secuencia de ADN o ARN que se trata de estudiar y de forma secuencial hacer accesible a la sonda, la secuencia de ácido nucleico que se pretende detectar -pretratamiento de la muestra-, desnaturalizar el

ADN -desnaturalización-, permitir la hibridación de los ácidos nucleicos, y visualizar la reacción -revelado inmunológico- para proceder a su lectura en un microscopio de fluorescencia (194).

En la actualidad podemos distinguir cuatro tipos distintos de sondas de ADN, dependiendo del tamaño y la localización de las secuencias que identifican (195;196). Las *sondas  $\alpha$ -centroméricas*, reciben esta denominación al identificar secuencias de ADN presentes en los centrómeros de los cromosomas, están formadas por una secuencia repetitiva de ADN que hibrida con el ADN de la región centromérica del cromosoma y se emplean habitualmente para la detección de alteraciones numéricas de cromosomas tanto en metafases como sobre núcleos interfásicos. Las *sondas teloméricas y de secuencia única* hibridan con el ADN de una región genómica muy concreta correspondiente a un gen o a una banda cromosómica; con ellas es posible detectar alteraciones numéricas y estructurales, tanto en metafase como en interfase. Finalmente, las *sondas de pintado cromosómico*, están formadas por una batería de sondas de tamaño reducido que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma; estas sondas permiten visualizar alteraciones cromosómicas tanto de tipo numérico como estructural sobre metafases, son de gran utilidad cuando los cromosomas son de mala calidad y con la citogenética convencional quedan dudas sobre la naturaleza y origen de algunos cromosomas o alteraciones cromosómicas.

En la Tabla 1 se recogen de forma genérica las principales ventajas y limitaciones de esta técnica (FISH), respecto a la citogenética convencional. Como hemos mencionado anteriormente, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la citogenética convencional es la ausencia de metafases; su gran ventaja reside en ser una técnica que permite el análisis simultáneo de todo el genoma. Las técnicas de FISH han resuelto, al menos en parte, el primer problema, al permitir analizar núcleos en interfase; en cambio su gran limitación reside en que no se puede emplear como una técnica de rastreo diagnóstico, como el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones genéticas de forma dirigida. Así, aunque la FISH no permite obtener una información global del genoma, facilita el estudio simultáneo de varias regiones del genoma, de forma rápida, sensible, específica y reproducible tanto sobre núcleos interfásicos como en cromosomas metafásicos (194;197). Una variante más reciente de las técnicas de FISH es la CGH. La CGH (198) se fundamenta en la hibridación competitiva de dos ADNs, el ADN tumoral y un ADN control normal, cada uno marcado con un fluorocromo distinto. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y son

hibridados sobre cromosomas metafásicos normales. Estos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado con ambos fluorocromos es la misma, el resultado final son cromosomas en los que no se observa predominio de ningún fluorocromo. En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia o pérdida cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor o menor, respectivamente y la hibridación de esa zona resultará en una mayor o menor proporción de fluorocromo del tumor. De esta forma, la CGH permite la detección de ganancias y/o pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación (199). Un inconveniente de esta técnica es su sensibilidad, ya que sólo permite la detección de anomalías presentes en la mayoría de las células de la muestra, sin que la información obtenida esté referida a células individuales.

## **II.HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

En general, hoy se acepta que el comportamiento clínico y biológico de una neoplasia depende de forma importante de las alteraciones genéticas subyacentes. No obstante, en la actualidad el conocimiento existente acerca de las aberraciones cromosómicas presentes en los CPNM sigue siendo parcial y limitado. Ello se debe, entre otras razones, a que en la mayoría de los estudios realizados se han empleado técnicas citogenéticas convencionales para su análisis e identificación, metodología que presenta algunos inconvenientes. De entre ellos, merece destacar: 1) la dificultad en obtener metafases, teniendo en cuenta que los CPNM habitualmente presentan una fracción de crecimiento baja; 2) la posible selección en cultivo de clones no representativos del tumor y; 3) el pequeño número de metafases analizadas respecto a la celularidad global del tumor.

La mayoría de los CPNM muestran algún tipo de alteración citogenética, desconociéndose en gran medida la frecuencia exacta de muchas de ellas y sus implicaciones en el comportamiento clínico de la enfermedad. De este modo, la información disponible sobre la incidencia exacta de distintas alteraciones cromosómicas en este tipo de tumores es imprecisa o inexistente. Además, dado que la mayoría de los estudios disponibles se han realizado tras cultivo de muestras tumorales, evaluando únicamente células en metafase, la identificación de la heterogeneidad genética existente a nivel intratumoral se ve limitada por el escaso número de células analizadas. Este inconveniente podría verse superado mediante el empleo de técnicas citogenéticas que permiten el análisis tanto de metafases como de núcleos interfásicos, a través del uso de sondas, dirigidas frente a los cromosomas o regiones cromosómicas más frecuentemente alterados en los CPNM.

Las anomalías en los cromosomas 18 y 14 han sido objeto de múltiples investigaciones, probablemente consecuencia de su frecuencia y de su controvertida repercusión en la supervivencia, como explicamos detalladamente en este trabajo. Además, el gen *BCL2* y consecuentemente la proteína BCL2, juegan un papel crucial en la regulación de la apoptosis y por tanto, en el desarrollo tumoral habiéndose propuesto las alteraciones del gen y de la proteína como potenciales marcadores pronósticos en el CPNM. Por este motivo, deberíamos suponer que la sobre-expresión de BCL2 estaría relacionada con una mayor supervivencia de células tumorales pero los resultados observados en la literatura son contradictorios. Con respecto a KI-67, ha sido el anticuerpo monoclonal más empleado para estimar la actividad proliferativa de los CPNM. Así, en estos tumores, niveles elevados de KI-67/MIB1 se han correlacionado

con un fenotipo aberrante, asociado a subtipos histológicos más agresivos del tumor (200) aunque también hemos evidenciado una gran variabilidad en los resultados de los diferentes autores. Esta heterogeneidad podría ser debida a que en los CPNM, la actividad proliferativa no está distribuida de forma homogénea en las distintas zonas del tumor.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

### **Objetivo general:**

Determinar la incidencia de alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas 14 y 18 en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de pulmón y profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética y de las vías de evolución clonal, a nivel intratumoral y entre diferentes tumores, investigando además las implicaciones clínicas y biológicas de los hallazgos anteriores.

### **Objetivos específicos:**

1.- Determinar la incidencia de alteraciones numéricas y estructurales en los cromosomas 14 y 18 mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente multicolor sobre núcleos interfásicos (iFISH) en una serie amplia de pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de pulmón.

2.- Identificar, a través de marcajes simultáneos en la misma célula para diferentes secuencias de ADN, la presencia de distintos subclones de células neoplásicas a nivel intratumoral y establecer las posibles relaciones evolutivas existentes entre ellos.

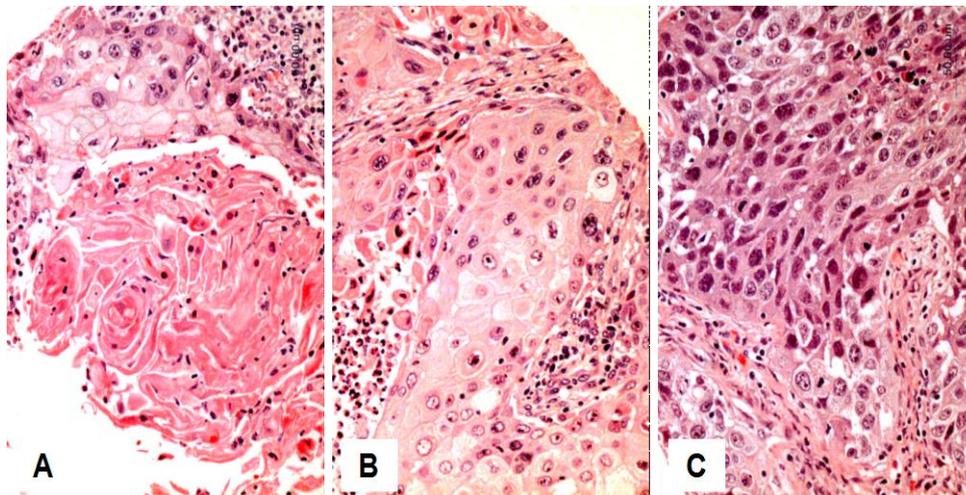
3.- Valorar en este mismo grupo de pacientes la expresión de las proteínas BCL2 y KI-67 mediante técnicas de inmunohistoquímica.

4.- Establecer las implicaciones de las anomalías genéticas e inmunohistoquímicas detectadas en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo del tumor.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1. Pacientes

En el presente estudio se analizaron 68 pacientes diagnosticados y tratados entre 2000 y 2004 en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de Salamanca. Todos los pacientes fueron diagnosticados de carcinoma epidermoide de pulmón (n=68) tras cirugía. El diagnóstico se estableció en todos los casos de acuerdo a criterios histológicos bien establecidos (24) (Figura 2). De los 68 pacientes analizados, 97% fueron hombres y 3% mujeres, con edades comprendidas entre los 47 y 87 años (media de  $70,5 \pm 9,5$  años). El 53% de los pacientes eran fumadores activos (o exfumadores desde hacía menos de dos años) y el 47% llevaba más de dos años sin fumar. Desconocemos la evolución de dos pacientes. En el momento de este estudio (enero 2008), el 49% de los pacientes habían fallecido, mientras que el 51% continuaban vivos. Hemos encontrado una supervivencia entre 106 y 2197 días (media de  $1223 \pm 663$  días). Desde el punto de vista histopatológico, de acuerdo con la clasificación de la OMS (24), el 1% de los tumores se clasificaron como bien diferenciados, el 31% como moderadamente diferenciados y 68% pobremente diferenciados. Según la clasificación TNM, la mayoría de los pacientes se encontraban en estadio clínico localizado (52% en estadio I y 31% en estadio II); el 13% se encontraban en estadio IIIA y el 4% en estadio IIIB.

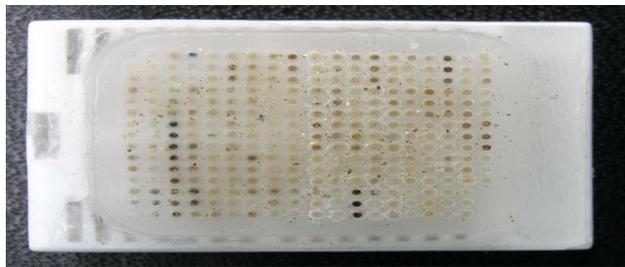


**Figura 2:** Imagen histológica de carcinomas epidermoides con diferente diferenciación. **A:** Bien diferenciado con formación de queratina. **B:** moderadamente diferenciado con diferenciación escamosa clara pero sin formar queratina. **C:** Pobremente diferenciado con escasa diferenciación escamosa visible en la presencia de algunas espinas intercelulares. HE.

### 3.2. Estudio Morfológico

#### 3.2.1. Matrices de tejidos (“*tissue microarrays*”)

Para nuestro estudio confeccionamos dos “*tissue microarrays*” idénticos (para estudios inmunohistoquímicos y estudios genéticos) con la inclusión de los 68 tumores cada uno, además de los respectivos controles -parénquima pulmonar distal, glándulas, bronquio, ganglios BCL2+ y amplificación del gen BCL2 por iFISH- (Figura 3). Todas las muestras se incluyeron por triplicado, siguiendo los criterios establecidos por Kononen y cols. (201).



**Figura 3.** Imagen de uno de los bloques de parafina utilizados para el estudio.

Se prepararon los bloques donantes de parafina, con un mínimo aconsejado de 2 mm de profundidad tisular y con una adecuada preservación antigénica durante el proceso de fijación. Seleccionamos la zona elegida en el bloque de parafina. Confeccionamos una plantilla, identificando todos los cilindros y su disposición en el array. En un bloque de parafina en blanco, de 40x25 mm, utilizado como receptor de las muestras titulares, se introdujeron los cilindros seleccionados con agujas de 0,6mm, ajustando la profundidad de descenso de las agujas aproximadamente a 3mm. Una vez terminado, incubamos el bloque en una estufa a 50°C durante 10 minutos aproximadamente. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los orificios del “*array*” del bloque receptor. Se sacaron los bloques de la estufa y se presionaron sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie. Se cortaron a 3-4 micras, se pasaron por parafina líquida para almacenar los cortes. A partir de aquí se procesaron los cortes histológicos como cualquier corte de tejido.

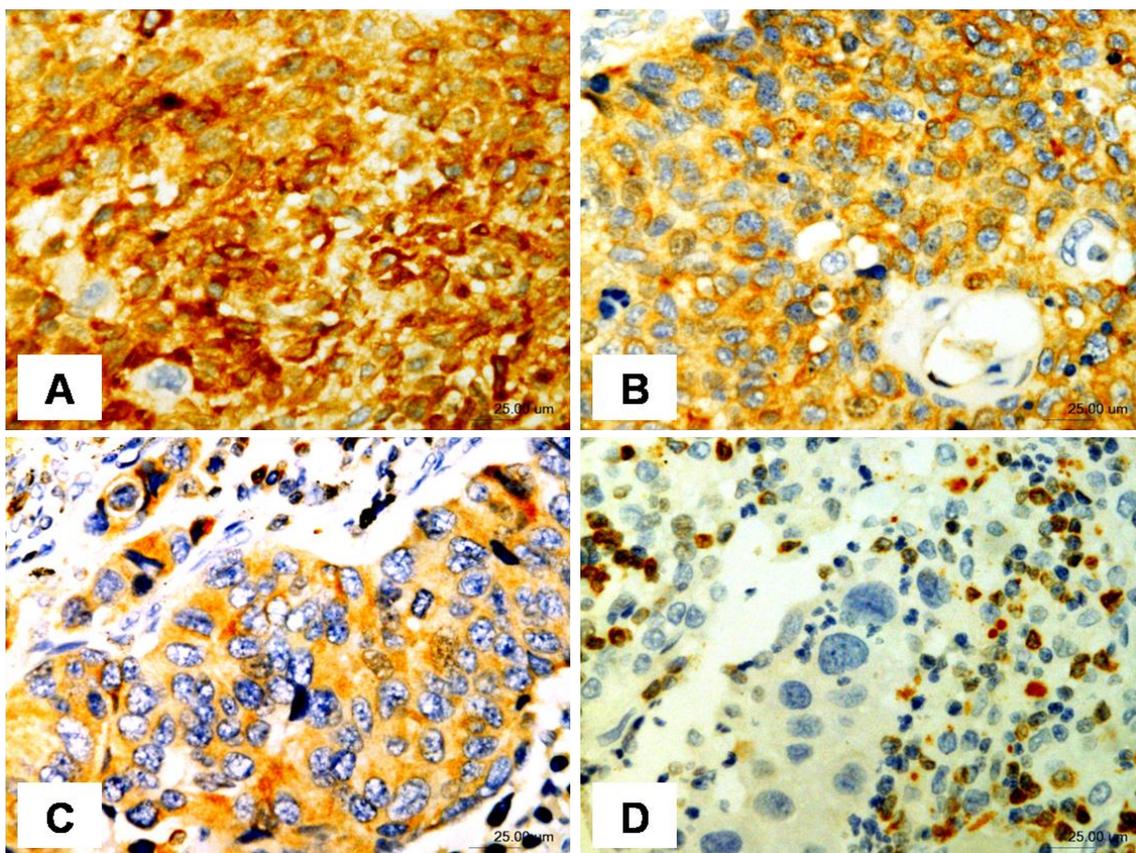
#### 3.2.2. Técnica de inmunohistoquímica

En nuestro trabajo la técnica de inmunohistoquímica fue realizada sobre tres cortes obtenidos del “*tissue microarrays*”. La incubación de los anticuerpos y reactivos

fue realizada de modo automático mediante el procesador OPTIMAX PLUS v 2.7 (A. Menarini Diagnostics, San Diego, USA). A continuación, se muestra el protocolo seguido para la realización de la técnica:

-Sección mediante microtomo LEITZ de las muestras incluidas en la matriz: cortes entre 3 y 5 micras. -Mantenimiento en estufa MEMMERT a 60° durante 24 horas. -Desparafinación mediante solución Histo-Clear II (National Diagnostics, Somerville, NJ, USA) en 4 pases de 5 minutos. -Rehidratación, 4 pases de 5 minutos en solución de etanol (Merck, Darmstadt, Germany) a concentración decreciente para concluir con agua durante 5 minutos. -Desenmáscaramiento antigénico mediante olla a presión en solución Antigen Retrieval Citra Solution (Menarini, Firenze, Italy) durante 5 minutos a temperatura superior a 130° (KI-67). -Desenmascaramiento proteolítico mediante olla a presión en solución Antigen Retrieval Citra Solution (Menarini, Firenze, Italy), 5 minutos en temperatura ambiente (para la expresión de BCL2). -Enfriamiento progresivo durante 20 minutos en solución de desenmascaramiento antigénico (para la expresión de KI-67). -Lavado de 5 minutos con agua. -Bloqueo de Peroxidasa endógena a 5 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. -Lavado de 5 minutos con PBS. -Incubación del anticuerpo primario: **BCL2**: Ac monoclonal BCL2 (Novocastra, Newcastle, UK) dilución 1:50, durante 30 minutos. **KI-67**: Ac monoclonal KI-67 (Vitro, Granada, España) dilución 1:100, durante 30 minutos. -Lavado de 5 minutos con PBS. -Incubación del anticuerpo secundario (Multi link MD, Granada, España) durante 20 minutos. -Incubación del anticuerpo secundario (polímero) durante 20 minutos. -Incubación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 minutos. -Solución cromógeno-sustrato: Diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos. -Contratinción con Hematoxilina. -Lavado, deshidratación y montaje con resina.

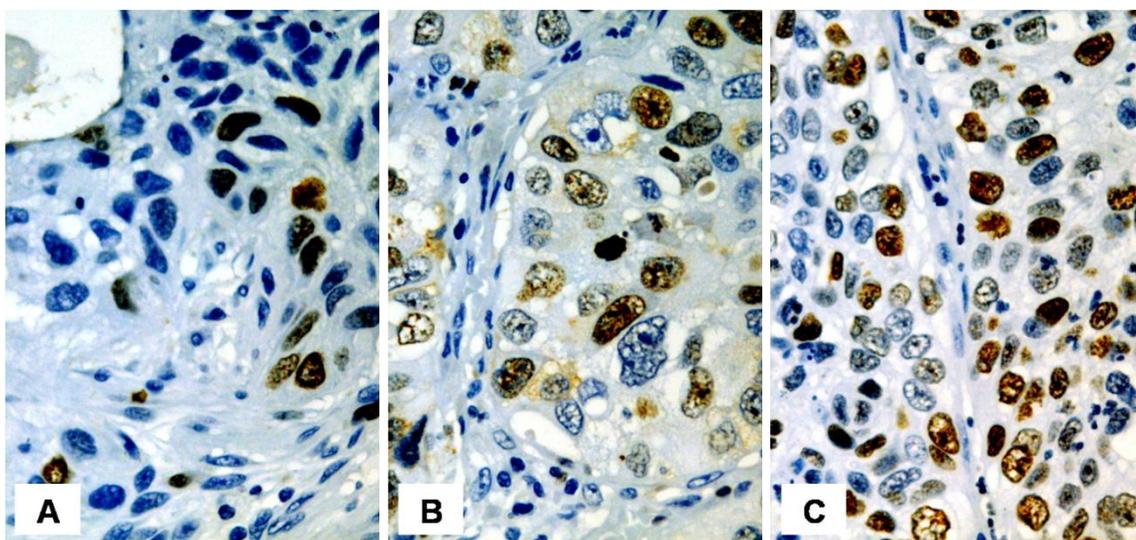
Para el estudio de la expresión de BCL2, además de valorar la positividad de las células tumorales (>15%), realizamos un estudio semicuantitativo siguiendo los criterios de Haura E.B. y cols. (202), estimando el porcentaje de células que expresan la proteína y la intensidad de la misma. La intensidad fue clasificada de 0 al 3: 0= no tinción, 1= tinción baja, 2= tinción media, 3= tinción alta (Figura 4).



**Figura 4:** Imagen histológica de las diferentes intensidades en la expresión proteica del BCL2.  
 A: Intensidad 3. B: Intensidad 2. C: Intensidad 1. D: Intensidad 0. IHQ BCL2.

Se cuantificaron las muestras por triplicado y los valores se obtuvieron sumando los resultados de multiplicar la intensidad por el porcentaje de células estimadas ( $3 \times \% \text{ de células con intensidad alta} + 2 \times \% \text{ de células con intensidad media} + 1 \times \% \text{ de células con intensidad baja} + 0 \times \% \text{ de células sin tinción}$ ) / 3 y posteriormente multiplicado por 100.

La expresión de BCL2 se valoró como positivo cuando se teñía el citoplasma. Todos los controles positivos incluidos en la matriz, mostraron expresión fuertemente positiva. En todos los casos se consideró como positivo tinciones superiores a un 15% de las células tumorales estudiadas. Así, hemos considerado como expresión baja cuando la tinción oscilaba entre el 15% y 30% de las células analizadas; moderada, entre el 31-70%; y alta, >71% (Figura 4). Esta misma escala la utilizamos para la valoración de KI-67/MIB1 (índice de proliferación bajo, 10-30%; moderado, 31-70%; y alto, >71%) (Figura 5).

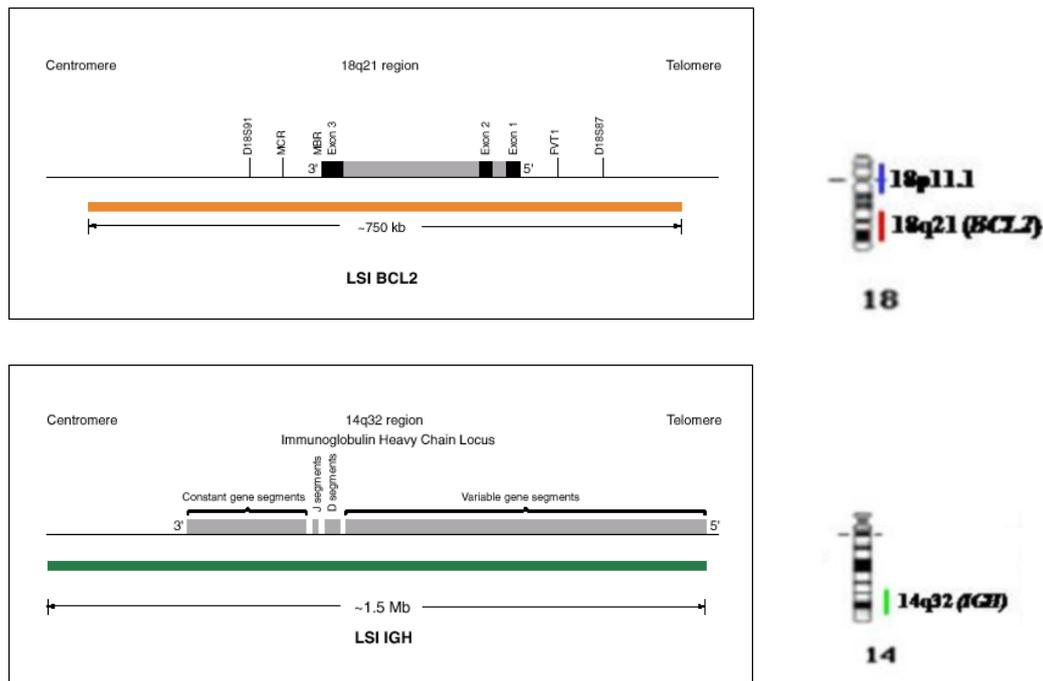


**Figura 5:** Imagen histológica de la diferente expresión del índice de proliferación KI-67/MIB1.

A: Índice de proliferación bajo. B: Índice de proliferación moderado. C: Índice de proliferación alto.  
IHQ KI-67/MIB1.

### 3. 3. Estudio genético

El análisis del número de copias del cromosoma 18 por núcleo se realizó mediante iFISH con una sonda específica para el gen *BCL2* localizado en la región 18q21 (marcada con un fluorocromo rojo, spectrum orange). Como sonda control se empleó ADN complementario a la región centromérica del cromosoma 18 (marcado con spectrum aqua; Vysis, Downers Grove, II). Simultáneamente en todas las muestras se hibridó una tercera sonda dirigida frente al gen de la *IGH* localizado en la región 14q32 del cromosoma 14 (marcada con fluorocromo que emite en color verde, spectrum green; Vysis, Downers Grove, II) con objeto de analizar las alteraciones asociadas al cromosoma 14. La secuencia y el tamaño de las sondas específicas de locus quedan reflejadas en la Figura 6.



**Figura 6.** Sondas de hibridación específicas del locus de los genes *BCL-2* (18q21) e *IGH* (14q32). Cromosomas 18 y 14 con las secuencias analizadas en este estudio (18p11, 18q21 y 14q32).

Los portas con las matrices tisulares se incubaron de forma secuencial con soluciones que contenían 0.1 mg/ml de pepsina (10 minutos a 37°C), formaldehído al 1% (10 minutos a temperatura ambiente) y finalmente se deshidrataron en etanol empleando técnicas ampliamente descritas (203). A continuación, se realizó una desnaturalización del ADN celular y de la sonda a 75°C (1 minuto); posteriormente los portas se incubaron a 37°C en un termociclador (Hybrite™) durante toda la noche. El revelado de las señales se realizó a 46°C con una solución de 50% formamida en 2xSSC seguido de un lavado en PBS-tween. La contratinción de las células se llevo a cabo con 4'6' diamino -2-fenilindol (DAPI).

El número de señales de hibridación/célula se cuantificó utilizando un microscopio de fluorescencia (Leitz Wetzlar, Germany) equipado con un objetivo de inmersión de 100x; se realizó un conteo de al menos 100 células por muestra. Las diferentes alteraciones numéricas en ambos genes fueron definidas por la pérdida o ganancia de las correspondientes señales de fluorescencia en ambos genes en más del 10% de los núcleos. Para definir la existencia de pérdidas o ganancias de este cromosoma, se analizó la frecuencia de aparición de células con un número de señales de hibridación bajo o alto (respecto a lo esperado) para la misma combinación de sondas, en un grupo de 10 muestras control.

### **3.4. Análisis estadístico**

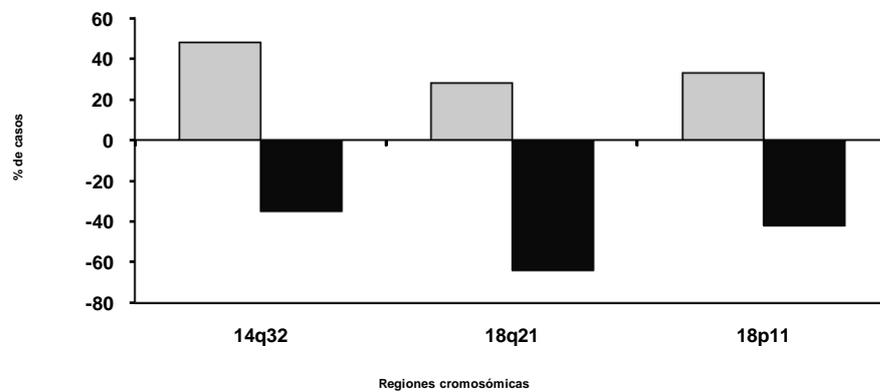
El análisis estadístico de todas las variables incluidas en este trabajo, se realizó con el programa informático SPSS 12.0 (Software Programs, Chicago, IL.). Con el fin de establecer la significación estadística de las diferencias observadas entre grupos, se usaron los test T de Student y U de Mann-Whitney para variables continuas, dependiendo de que estas presentaran una distribución normal o no. Para variables cualitativas, se usó la  $X^2$  de Pearson (SPSS 12.0).

El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo al método actuarial de Kaplan y Meier, explorando la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia mediante el test Logrank (SPSS12.0). En todos los casos se consideró que, existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de  $p < 0.05$ .

## **IV. RESULTADOS**

#### 4.1. Incidencia de alteraciones numéricas de los cromosomas 14 y 18 en carcinoma epidermoide de pulmón detectadas mediante iFISH.

En términos globales, de los 68 carcinomas epidermoides incluidos en el estudio, prácticamente todos (n=67) mostraron anomalías cromosómicas para al menos una de las tres regiones cromosómicas analizadas (18p11, 18q21, 14q32). En su conjunto, las pérdidas cromosómicas fueron más frecuentes que las ganancias, 47% vs. 36%, respectivamente (Figura 7). Los resultados más relevantes en relación con las alteraciones numéricas y/o estructurales de las regiones cromosómicas estudiadas quedan reflejados en la Tabla 2. Como puede observarse en ella, las anomalías más frecuentemente encontradas correspondieron a la monosomía/delección del cromosoma 18 y a la monosomía del cromosoma 14 (60% y 35% de los casos, respectivamente), encontrando en ocasiones estas pérdidas asociadas a cariotipos hiperdiploides.



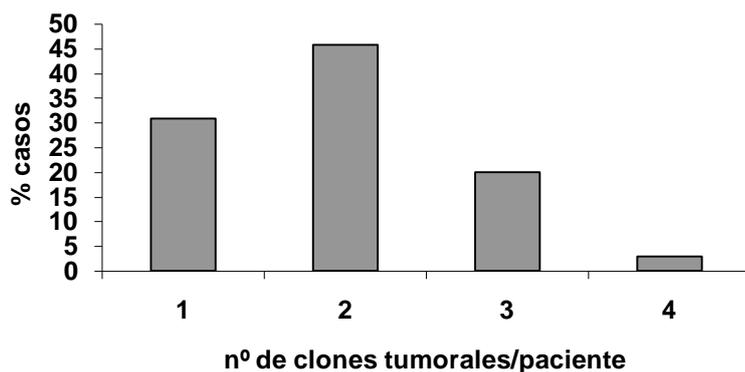
**Figura 7.** Incidencia de alteraciones para las regiones cromosómicas 14q32, 18p11.1 y 18q21 mediante iFISH en 68 pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón. Resultados expresados como porcentajes de casos.

Anomalía cromosómica	Región cromosómica (Gen)	
	14q32 ( <i>IGH</i> )	18p11.1/18q21 ( <i>CEN/BCL2</i> )
<b>Normal</b>	12	2
<b>Ganancias</b>		
q <sup>+</sup>		3
Trisomía	16	4
Trisomía del(q)		3
Trisomía q <sup>+</sup>		3
Tetrasomía	4	1
Tetrasomía del(q)		3
Tetrasomía q <sup>+</sup>		3
Polisomías	12	4
<b>Pérdidas</b>		
Monosomía	24	28
del(q <sup>-</sup> )		11

Resultados expresados como número de casos.

**Tabla 2.** Frecuencia de alteraciones cromosómicas en pacientes con carcinoma de pulmón epidermoide (n=68).

Es interesante señalar que con relativa frecuencia, las pérdidas cromosómicas fueron frecuentes en una mayor proporción de células neoplásicas que las ganancias, detectándose estas últimas de forma reiterada, en pequeños clones que incluían células tumorales tetraploides. El uso simultáneo de tres sondas nos permitió caracterizar cada uno de los clones neoplásicos presentes en cada una de las muestras analizadas, observándose que en cada muestra, coexisten dos ó más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. En este sentido, los estudios de iFISH mostraron que de los 68 casos analizados, 52 (76%) presentaban uno o dos clones tumorales, la mayoría de estos casos correspondieron a tumores epidermoides pobremente diferenciados (75%) (Tabla 3). Por el contrario, en los 16 casos restantes (24%) se identificaron 3 o más clones neoplásicos (Figura 8).



**Figura 8.** Número de clones neoplásicos en 68 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón. Resultados expresados como porcentaje de casos.

Nº de clones	Grado de diferenciación tumoral		P=0.019
	Bien/moderado	Pobre	
≤ 2	13	39	
≥ 3	9	7	

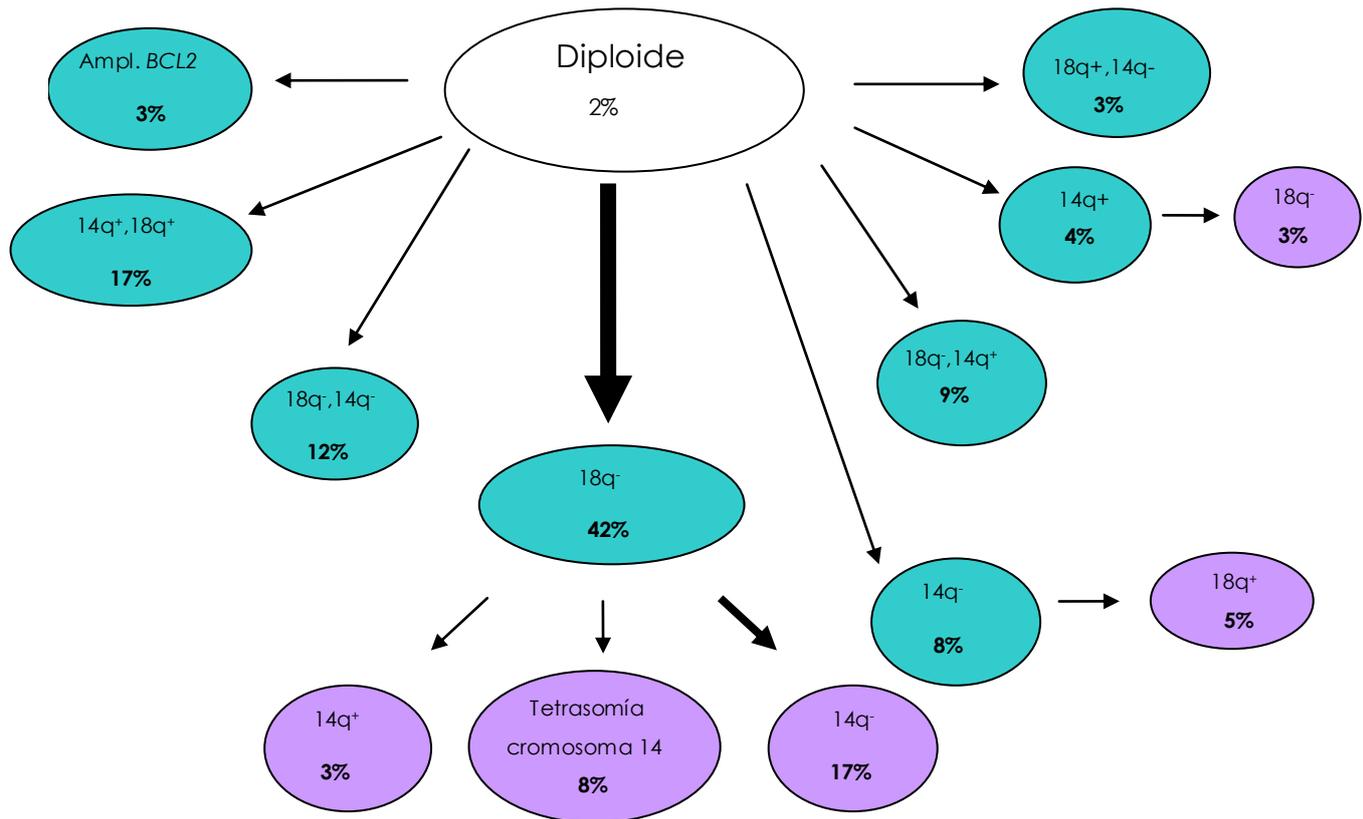
Resultados expresados como número de casos.

**Tabla 3.** Correlación entre el número de clones tumorales detectados por iFISH y el grado de diferenciación tumoral (n=68).

Si agrupamos el tipo de alteración cromosómica encontrada en la célula ancestral del tumor, observamos que la anomalía más frecuente fue la monosomía y/o deleción de uno o más cromosomas (62%) y en menor frecuencia trisomias/amplificaciones y tetrasomias (15%). De las monosomías encontradas como alteración inicial, el 49% de los casos correspondía a la monosomía de un único cromosoma, siendo la monosomía del cromosoma 18/18q-, la alteración más frecuentemente detectada en la célula ancestral tumoral. Además de las pérdidas cromosómicas encontradas en célula ancestral tumoral, la presencia de patrones citogenéticos asociados a ganancias cromosómicas se encontraron en un 21 % de los pacientes de los cuales una quinta parte (20%) correspondían a tumores tetraploides.

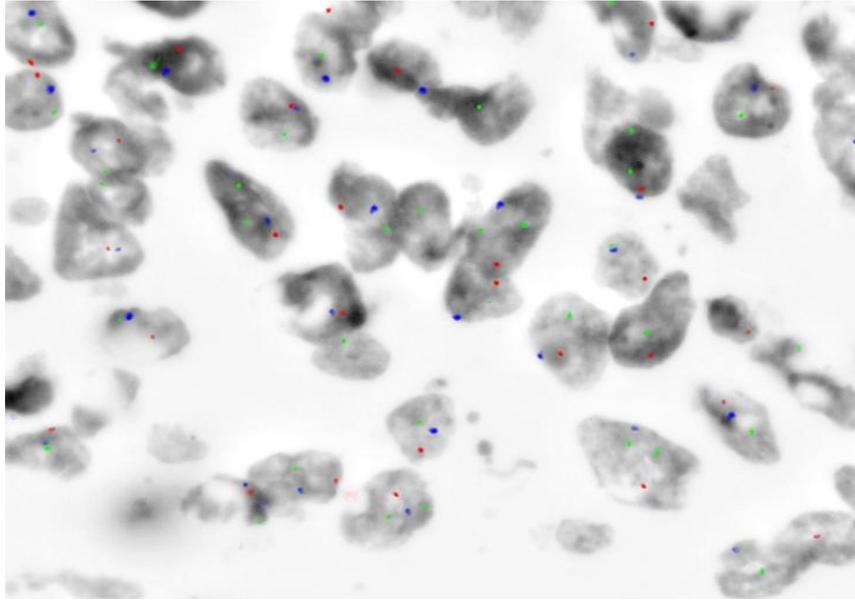
En tumores histológicamente avanzados, estadios IIIA y IIIB, fueron frecuentes las ganancias del cromosoma 14 asociadas a otras alteraciones (ganancias o pérdidas) del cromosoma 18 (4/11 pacientes). Los clones tetraploides fueron evidenciados en el 18% de estos tumores evolucionados (2/11). Por el contrario, en los tumores en estadio I/II, la lesión cromosómica inicial correspondió de forma habitual a pérdidas cromosómicas aisladas, siendo más frecuente la pérdida y/o delección del cromosoma 18/18q- que la pérdida de la región cromosómica 14q32 (44% vs. 7%).

Hemos observado que en una importante proporción de los casos analizados coexistían dos o más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. Además, en todos los casos analizados, se podía establecer una clara relación entre los diferentes clones de células tumorales encontrados en el tumor y de esta forma establecer un modelo hipotético de evolución clonal, a nivel intratumoral. Aunque los patrones de alteraciones citogenéticas observados a nivel intratumoral fueron con frecuencia comunes a dos o más tumores, la incidencia exacta de cada uno de estos patrones era variable. Un análisis detallado de los diferentes clones de células tumorales presentes en cada muestra analizada nos permitió formular una hipótesis sobre los diferentes patrones de evolución clonal en estas neoplasias. La Figura 9 resume el modelo hipotético de las vías de aneuploidización intratumoral más frecuentemente encontradas para las tres regiones cromosómicas estudiadas en los carcinomas epidermoides de pulmón. De acuerdo a este modelo hipotético de evolución clonal, tan solo uno de los 65 pacientes analizados (puesto que en 3 de los 68 pacientes iniciales no hemos podido constatar dicha evolución clonal) no mostró anomalías para las tres regiones estudiadas. Para el resto de los casos analizados la monosomía/delección del cromosoma 18/18q- de forma aislada (n=27; 42%) o en combinación con la pérdida (n=8; 12%) o ganancia (n=6; 9%) simultánea del cromosoma 14, representarían los eventos citogenéticos más tempranos en el proceso de transformación neoplásica de los carcinomas de pulmón epidermoides ya establecidos y las ganancias de ambos cromosomas, a pesar de ocurrir en estadios tempranos en una pequeña proporción de todos los carcinomas estudiados (n=11; 17%), representarían el evento más frecuente en el proceso de progresión tumoral.



**Figura 9.** Heterogeneidad genética de carcinoma epidermoide de pulmón: Modelo hipotético de aneuploidización intratumoral, para las tres regiones cromosómicas analizadas, asociado a la progresión maligna de los carcinomas epidermoides de pulmón (n=65). Los porcentajes muestran la incidencia de casos con un clon tumoral que presenta un patrón cromosómico específico ( $\geq 2$  de los casos).

La Figura 10 muestra la vía de evolución clonal a nivel intratumoral más frecuentemente encontrada en los carcinomas epidermoides de pulmón. Representa un conjunto de núcleos hibridados con tres sondas, una dirigida a la región cromosómica 14q32 representada en color verde y otras dos dirigidas a las regiones 18q21 y 18p11.1, representadas en color rojo y azul, respectivamente. En la figura se muestra la coexistencia de dos clones de células tumorales definidos por la hibridación simultánea de las tres sondas de ADN: un clon muestra la pérdida aislada del cromosoma 18 mientras que el segundo clon además presenta la pérdida simultánea de ambos cromosomas (alteración secundaria).



**Figura 10.** Conjunto de núcleos interfásicos de un carcinoma epidermoide de pulmón hibridados con tres sondas: una para la región cromosómica 14q32 (gen *IGH*, puntos verdes), otra para la región 18q21 (gen *BCL2*, puntos rojos) y otra dirigida a la región centromérica del cromosoma 18 (18p11.1, puntos azules).

#### **4.2. Estudios de expresión de KI-67/MIB1 Y BCL2 en carcinoma epidermoide de pulmón.**

El índice de proliferación (KI-67) se estudió en 67 de los 68 pacientes incluidos en el presente estudio, 7 (10%) de ellos mostraron una expresión inferior al 10%, considerándose negativo. No obstante, la mayoría de los pacientes mostraron un índice de proliferación bajo (40 pacientes; 60%), seguido de 11 pacientes (16%) que lo expresaban con intensidad moderada mientras que 9 (14%) lo hicieron con alta intensidad. Además, encontramos una asociación estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ) entre los tumores pobremente diferenciados y la presencia de un índice de proliferación moderado-alto (17/45; 38%). Especial relevancia merecen las asociaciones encontradas entre las 8 vías que hemos descrito en el modelo hipotético de evolución clonal, a nivel intratumoral, y el índice de proliferación de los tumores. Merece destacar que el subgrupo de pacientes ( $n=27$ ; 42%) que mostraron como alteración citogenética en célula ancestral la monosomía/delección 18/18q<sup>-</sup>, presentaron un índice de proliferación bajo ( $p=0.09$ ).

De los 67 pacientes estudiados, se observaron varios grados de tinción de BCL2; 54 pacientes (81%) no mostraron tinción para BCL2 o lo hicieron con escasa intensidad. Un 10% (7 pacientes), lo expresaba con intensidad moderada y/o en una cantidad moderada de células mientras que un 9% (6 pacientes) lo expresaban intensamente y en un número mayor de células. Como se muestra en la Tabla 4, aquellos casos con pérdida del cromosoma 18/18q detectada por iFISH, se asociaron con los casos de baja expresión de BCL2 ( $p < 0.001$ ). Por el contrario, al comparar la expresión de BCL2 con el resto de variables clínicas estudiadas (sexo, edad, hábito tabáquico, grado de diferenciación, estadio clínico y evolución) no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas.

		Niveles de expresión BCL2			
		<15%	15-30%	31-70%	
	Monosomía	25	3	0	
	Normal	1	1	0	
	Hiperdiploide	8	1	0	
Cr. 18	q-	11	0	0	p<0.01
	hiperdiploide q-	6	0	0	
	q+	1	0	2	
	hiperdiploide q+	0	1	4	

Resultados expresados como número de casos

**Tabla 4.** Correlación entre las alteraciones numéricas y estructurales en el cromosoma 18 y los niveles de expresión de BCL2.

### **4.3. Implicación de las alteraciones genéticas detectadas en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo en carcinoma epidermoide de pulmón.**

La Tabla 5 muestra las características clínicas, histopatológicas y biológicas de los pacientes con CPNM clasificados según en el número de copias del cromosoma 14.

En este apartado hemos excluido a 3 pacientes en los que no nos constaba la evolución clonal del tumor y a 4 fallecidos dentro de los 45 días post-operatorios.

	Nº de copias del cromosoma 14/célula			
	1 (n =22)	2 (n =9)	> 2 (n =28)	
Edad (años)*	71±9	69 ±12	62±9	NS
Sexo (hombre/mujer)	95%/5%	100%/0%	95%/5%	NS
Fumador (si/no)	50%/50%	22%/78%	54%/46%	NS
Exitus (si/no)	60%/40%	66%/34%	36%/64%	<b>p=0.005</b>
Estadio (I,II/III,IIIB)	82%/18%	78%/22%	82%/18%	NS
Grado de diferenciación (bien,mod/pobr)	32%/68%	33%/67%	29%/71%	NS
Expresión de KI67				
<5%/5-30%/31-70%/>71%	9%/64%/18%/9%	12%/63%/0/25%	7%/67%/21%/5%	NS
Expresión de BCL2				
<15%/15-30%/31-70%/>71%	73%/18%/9%/0	100%/0/0/0	78%/7%/15%/0	NS
Nº de clones detectados por iFISH (1/>2)	53%/47%	77%/23%	4%/96%	<b>p &lt;0.001</b>
Alteraciones en célula ancestral				
Diploide	5%	11%	7%	
Pérdida cromosoma 14/18/ambos	32%/23%/36%	89%/0/0	25%/0/0	
Ampl. <i>BCL-2</i> /gan. cr.14/gan. ambos	0/0/4%	0/0/0	4%/7%/36%	<b>p&lt;0.001</b>
Gan. 18, perd. 14/perd.18, gan. 14	0/0	0/0	0/21%	
Alteraciones cromosoma 18				
Centrómero 18 (alterado/normal)	95%/5%	89%/11%	100%/0	NS
18q21 (alterado/normal)	91%/9%	89%/11%	93%/7%	NS

Resultados expresados como porcentaje de casos y \* media ± DS

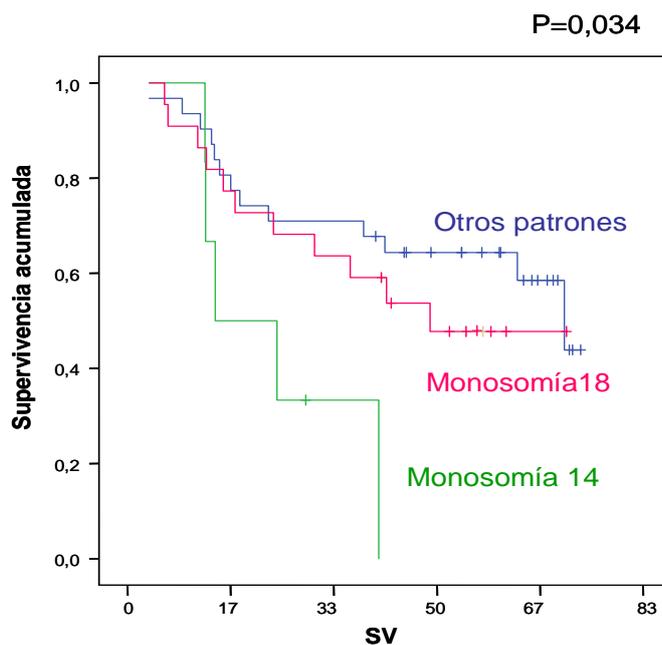
NS – estadísticamente no significativo (p > 0.05)

**Tabla 5.** Características clínicas, histopatológicas y biológicas de los carcinomas epidermoides de pulmón de acuerdo al número de copias del cromosoma 14/célula.

No se encontraron diferencias significativas ni en la edad ni en el sexo ni por el hábito de fumar entre los pacientes con monosomía, ganancia o un número normal de copias del cromosoma 14. Sin embargo, merece destacar que los pacientes que mostraron monosomía o un número normal de copias del cromosoma 14 eran mayores

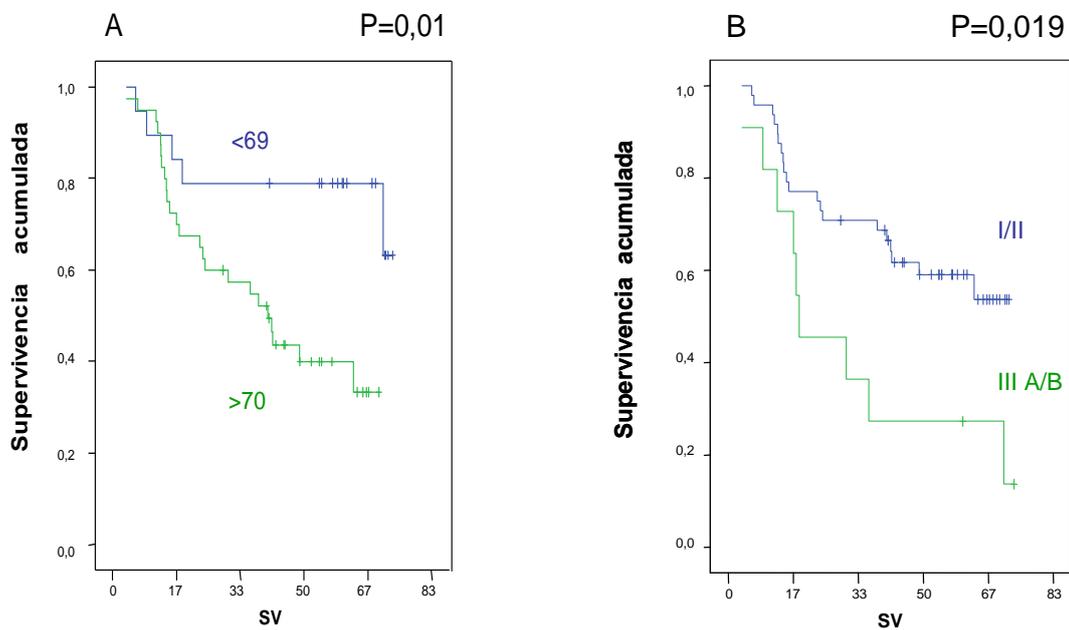
de 69 años y en la mayoría de ellos sólo se detectó un solo clon tumoral ( $p < 0.001$ ). Así mismo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes con respecto al estadio clínico, el grado de diferenciación tumoral, el índice de proliferación o la expresión del BCL2. Sin embargo, aquellos casos con polisomías para este cromosoma se asociaron significativamente con la presencia de dos o más clones neoplásicos.

Desde el punto de vista pronóstico, los pacientes con monosomía para el cromosoma 14 presentaron una incidencia superior de exitus (60%) respecto a los casos con polisomías (25%) o diploidía para este cromosoma (15%) ( $p=0.005$ ). Más aún, la monosomía del cromosoma 14 aislada en célula ancestral se asoció con una supervivencia significativamente más corta respecto a los casos con pérdida aislada del cromosoma 18 y diploidía o cualquier anomalía simultánea de ambos cromosomas (media de supervivencia 24 vs 46 vs 53 meses,  $p=0.034$ ), (Figura 11).



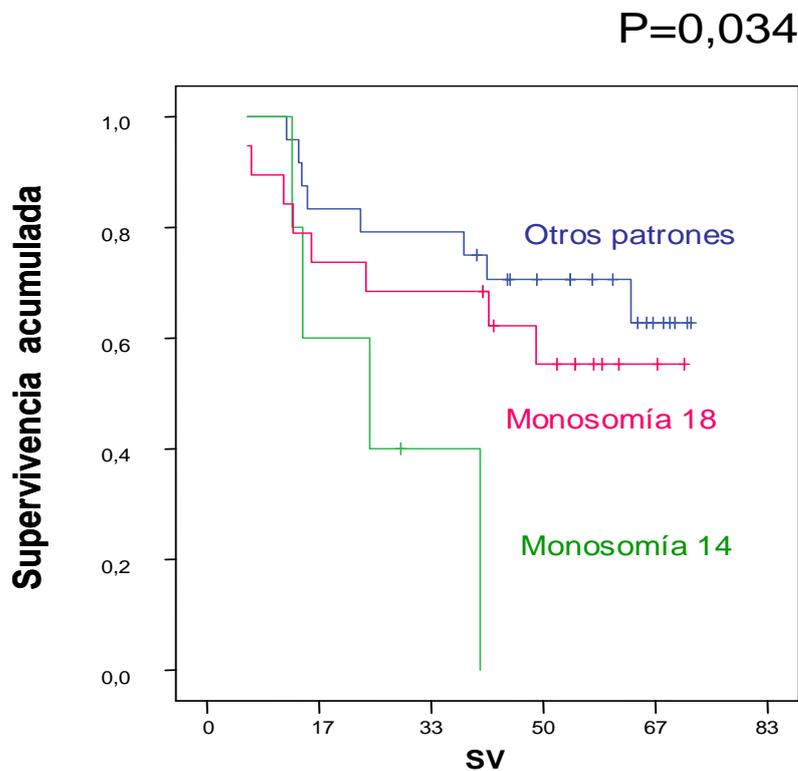
**Figura 11.** Relación entre la pérdida del cromosoma 14 en célula ancestral ( $n=48$  casos) de los pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón y la supervivencia.

A parte de las alteraciones cromosómicas estudiadas, otras características clínico-biológicas de la enfermedad mostraron también una influencia significativa como factores pronósticos adversos, principalmente la edad -mayor de 70 años- (media de supervivencia de 41 vs 60 meses,  $p=0.01$ ) y el estadio clínico del tumor -tumores IIIA y IIIB -(medias de supervivencia meses 33 vs 51 meses en estadios I y II,  $p=0.019$ ) -  
 Figura 12-



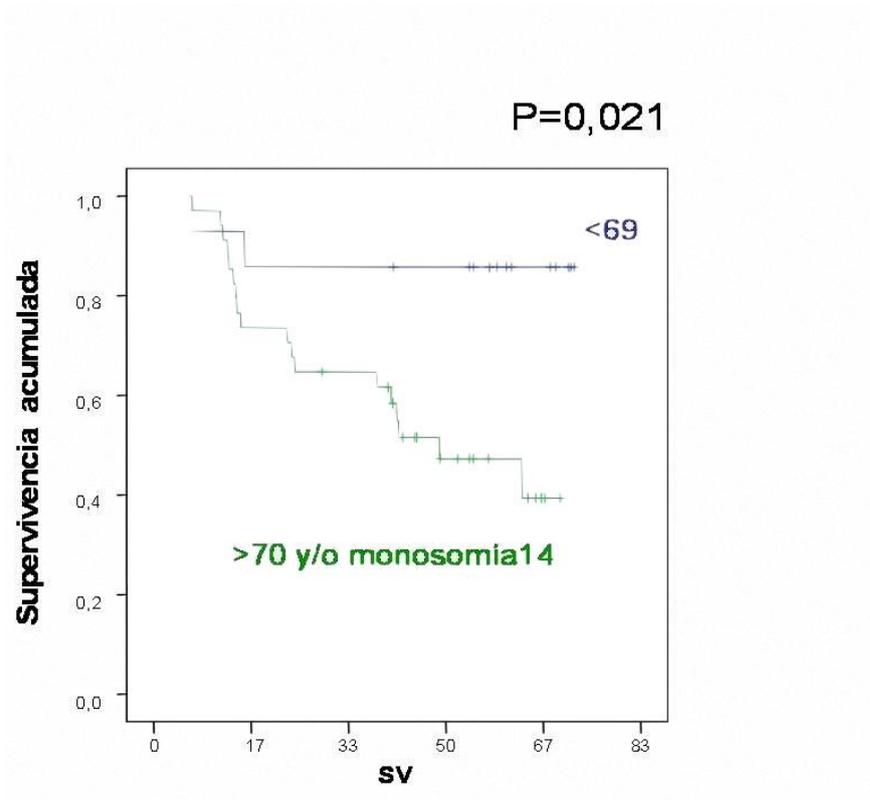
**Figura 12.** Relación entre algunas características clínico-biológicas del CPNM y la supervivencia libre de enfermedad (n=59): A) edad, B) estadio clínico.

Dado que la resección quirúrgica se considera el tratamiento de elección de individuos con carcinoma epidermoide de pulmón en estadio I y II, hemos estudiado el comportamiento de la pérdida del cromosoma 14 en pacientes con un estadio clínico potencialmente curable mediante cirugía (I y II). En este sentido, hemos observado que los pacientes con un estadio clínico localizado que presentaron pérdida del cromosoma 14 mostraron una supervivencia significativamente más corta; respecto a los casos I/II con pérdida aislada del cromosoma 18 y diploidía, ganancias o pérdida simultánea de ambos cromosomas (media de supervivencia 26 vs 49 vs 57 meses,  $p=0.034$ ), (Figura 13).



**Figura 13.** Supervivencia en meses en los pacientes en estadio clínico localizado (I/II,  $n=48$ ) en función de la pérdida del cromosoma 14, 18 o demás alteraciones en ambos cromosomas.

El análisis multivariante, en este grupo de pacientes (estadio I/II), mostró que las anomalías del cromosoma 14 y la edad del paciente constituyen la mejor combinación de parámetros individuales respecto a la supervivencia (media de supervivencia 45 vs 63 meses,  $p=0.021$ . Figura 14).



**Figura 14.** Pacientes con carcinoma epidermoide de pulmón en estadio clínico localizado (I/II,  $n=48$ ) distribuidos por edad y/o pérdida del cromosoma 14.

## **V. DISCUSIÓN**

### **5.1. Incidencia de alteraciones numéricas de los cromosomas 14 y 18 en CPNM detectadas mediante iFISH.**

De forma global, todos los carcinomas epidermoides analizados en este trabajo excepto uno mostraron alguna anomalía cromosómica, de acuerdo con los hallazgos previos de otros autores (65;67). La alteración cromosómica más frecuentemente encontrada en el presente estudio fue la deleción/monosomía del cromosoma 18/18q-, detectada en más de la mitad de los pacientes analizados (60%). Pese a la diversidad de los resultados encontrados en la literatura (51;97;145), la pérdida de material genético del brazo largo del cromosoma 18, observada con elevada frecuencia en los CPNM, podría ir asociada a la pérdida de genes localizados en este cromosoma, que como *BCL2* intervendrían en el desarrollo neoplásico de al menos, un grupo importante de carcinomas epidermoides. En este sentido, otras pérdidas cromosómicas que afectan a los cromosomas 1p, 11p y 22q han sido descritas con menor frecuencia que la pérdida del cromosoma 18 (50;51). La menor frecuencia de estas anomalías, respecto a las pérdidas del cromosoma 18, indicaría que estas alteraciones cromosómicas podrían representar cambios genéticos primarios menos relevantes en los CPNM o con mayor probabilidad, alteraciones secundarias asociadas a la progresión tumoral.

Las ganancias cromosómicas habitualmente se observaban en el contexto de pequeños clones de células tumorales tetraploides. En este sentido, merece destacar que cuando se consideraban estos clones tetraploides, las ganancias cromosómicas eran, en términos globales, más frecuentes que las pérdidas, si bien la proporción media de células que mostraban pérdidas cromosómicas en cada tumor era superior a las que presentaban ganancias. Estos hallazgos, unidos a la observación en cada tumor de una incidencia similar de ganancias en ambos cromosomas analizados, apoyaría la hipótesis de la existencia de tetraploidización durante el proceso de evolución clonal en una importante proporción de carcinomas epidermoides de pulmón. Además, la presencia de únicamente dos copias del cromosoma 18, en clones tetraploides, indicaría que la pérdida de este cromosoma ocurriría en un estadio anterior a la tetraploidización.

La frecuencia relativamente alta de clones tetraploides encontrados en el presente trabajo, contrasta con los resultados descritos previamente en la literatura. De hecho, la existencia de células tetraploides como resultado de la endoduplicación de células tumorales no ha sido descrita en los CPNM. Tal discrepancia podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que los subclones tetraploides representan

únicamente una pequeña fracción (entre 5% y 10%) de todas las células tumorales. Por lo tanto, podrían pasar inadvertidos si el análisis de las alteraciones cromosómicas se realizase sobre un pequeño número de metafases/células, como ocurre habitualmente cuando se utilizan técnicas de citogenética convencional. Alternativamente, las células tumorales tetraploides podrían sufrir una selección clonal negativa durante el cultivo.

Una vez establecida la incidencia individual de alteraciones para cada uno de los dos cromosomas estudiados, nuestro interés se centró en determinar la posible existencia de asociaciones entre las distintas alteraciones encontradas. En este sentido, encontramos una alteración estadísticamente significativa entre la pérdida entera del cromosoma 18 y la pérdida del cromosoma 14/14q-. En términos globales, las correlaciones observadas entre distintas anomalías cromosómicas en los carcinomas epidermoides de pulmón apoyan la hipótesis de la existencia de diferentes clones y vías de aneuploidización asociadas a inestabilidad cromosómica en estos tumores.

Por otro lado, hemos observado que los pacientes con polisomías del cromosoma 14 presentaban frecuentemente dos o más clones neoplásicos, mientras que quienes mostraban monosomía o eran diploides para este cromosoma sólo presentaban un clon tumoral. No hemos podido contrastar este hallazgo en la literatura revisada, puesto que la mayoría de los trabajos se limitan a describir las regiones del cromosoma 14 alteradas en este tipo de tumores (106) así como si se encuentra sobre o infraexpresado (44;103).

## **5.2. Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en los CPNM.**

Estudios recientes (58;204-206) indican que los CPNM de pulmón son tumores citogenéticamente heterogéneos, que con frecuencia muestran cariotipos complejos en los que se asocian cuatro o más alteraciones cromosómicas de tipo numérico y/o estructural (51;58).

A pesar de su marcada heterogeneidad genética, en la mayoría de los trabajos publicados se comparte la hipótesis de que el evento más temprano, implicado en la formación del tumor es la monosomía/delección 3/3p- (29;45). Estudios posteriores (43;50-56;100) describieron que tras la pérdida del cromosoma 3 se irían incorporando a la célula neoplásica otras anomalías cromosómicas que afectan principalmente a los cromosomas 2q, 5p, 7p, 9p, 13q, 14q y 18q. La elevada frecuencia de cambios genéticos asociados a pérdidas y ganancias cromosómicas sugieren que las anomalías asociadas a

inestabilidad cromosómica juegan un importante papel tanto en el desarrollo como en la progresión de los CPNM (71;72).

En los últimos años, en diferentes trabajos se han postulado modelos hipotéticos donde se recogen las vías de evolución clonal asociadas a la progresión de los CPNM, basándose en los cambios cariotípicos encontrados en tumores en distintos estadios histológicos. Sin embargo, estos modelos hipotéticos de evolución clonal se fundamentan en la extrapolación de los resultados citogenéticos obtenidos por comparación de diferentes tumores y no se han contrastado a nivel intratumoral. Desde hace tiempo se ha demostrado la existencia de heterogeneidad genética a nivel intratumoral en los CPNM (50-56) llegando recientemente a sugerirse que podría tratarse, además, de un evento relativamente frecuente (58).

Un pre-requisito importante a la hora de estudiar la heterogeneidad genética a nivel intratumoral, es la disponibilidad de técnicas que a través de la identificación simultánea de dos o más alteraciones cromosómicas en una misma célula tumoral, permitan la caracterización de todas y cada una de las distintas poblaciones celulares presentes en el tumor, en ausencia de selección clonal. En este sentido, mediante el empleo de técnicas de FISH, sobre núcleos interfásicos en una serie amplia de carcinomas epidermoides, observamos que en una importante proporción de los casos analizados coexistían dos ó más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. Además, en todos los casos analizados, se podía establecer una clara relación entre los diferentes clones de células tumorales encontrados en el tumor y así formular un modelo hipotético de evolución clonal a nivel intratumoral.

Aunque los patrones de alteraciones citogenéticas observados a nivel intratumoral fueron con frecuencia comunes a dos o más tumores, la incidencia exacta de cada uno de estos patrones era variable. Para poder identificar la secuencia mediante la que posiblemente se fueron acumulando distintas anomalías cromosómicas en un tumor que presentase múltiples subclones en el momento del diagnóstico, asumimos que las alteraciones comunes a todos los subclones representaban cambios tempranos. Por el contrario, los cambios citogenéticos tardíos únicamente estarían presentes en algunos de los subclones que formaban parte del tumor. De acuerdo al concepto de evolución clonal (207), la monosomía 18/18q- y la monosomía 14/14q- aislada o en combinación con la pérdida simultánea del cromosoma 18, representarían los eventos más tempranos en el proceso de transformación a carcinoma invasivo de los CPNM. La tetraploidización, a pesar de ocurrir en estadios tempranos en una pequeña proporción

de todos los CPNM, constituye una etapa tardía de la evolución clonal de muchos de estos tumores. Respecto a las anomalías del cromosoma 18, no existe uniformidad en los resultados encontrados en la literatura (145), de manera que mientras unos autores describen la anomalía del cromosoma 18 como un evento temprano (108;111;208), otros la describen (pérdida/delección -18/18q-) como un evento tardío en la progresión de la enfermedad (97).

En nuestro conocimiento, este constituye el primer intento para establecer un modelo de evolución clonal a nivel intratumoral en el CPNM basado en estudios de iFISH. Los demás modelos de progresión tumoral descritos hasta el momento están basados en las diferencias observadas en los patrones citogenéticos de tumores con distintos tipos histológicos (44;51;102;104). Estos modelos asumen que los CPNM progresan a estadios más avanzados de la enfermedad a la vez que irían acumulando un mayor número de anomalías cromosómicas. Así, se piensa que el cáncer de pulmón surge después de una serie de cambios histopatológicos progresivos -denominados preneoplásicos- en el epitelio bronquial. Esta evolución preneoplásica incluye la hiperplasia, metaplasia escamosa, displasia y carcinoma *in situ*. Nosotros también hemos encontrado una asociación significativa entre los tumores más avanzados (estadios IIIA y IIIB) y la presencia de cariotipos complejos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las vías de evolución clonal en pacientes con estadio clínico localizado son con frecuencia diferentes a las del CE extendido. Así, mientras que la pérdida del cromosoma 18/18q- como evento temprano constituye un hallazgo común en los carcinomas epidermoides con enfermedad localizada, este patrón de alteración genética sólo se observó en un grupo muy reducido de tumores en progresión.

Debido a que en el presente trabajo sólo se ha estudiado una pequeña parte de cada tumor y a que mediante la técnica de iFISH sólo hemos analizado una parte de todo el genoma (cromosomas 14 y 18), no podemos excluir la posibilidad de que existan subclones tumorales adicionales a los encontrados.

### **5.3. Estudios de expresión de BCL2 y KI-67/MIB1 en CPNM. Análisis de otras variables anatomoclínicas.**

Dentro de la biología del cáncer de pulmón, se han identificado múltiples factores responsables de la modulación del crecimiento tumoral y el pronóstico (209).

Como hemos señalado previamente, hemos realizado nuestro estudio en un grupo de 68 carcinomas epidermoides puesto que en nuestro medio y en otros trabajos este es el subtipo histológico más frecuente (137;177;210) y en él hay una mayor expresión de la proteína BCL2 (137;168;177;185).

M. Nagatake y cols. (108) describieron que la delección 18q- era más frecuente en los CPNM que en los CPM. Por otra parte, mientras que en nuestro estudio evidenciamos que aquellos pacientes con pérdida/delección -18/18q- (n= 28/11) no expresaban el BCL2 o lo hacían en escasa cuantía o intensidad ( $p < 0.001$ ), otros autores (108) encontraron que la hipermetilación aberrante de 18q21 no se correlacionaba con los niveles de expresión de proteica de BCL2. Tampoco hemos podido asociar la pérdida -18/18q- con el estadio clínico a diferencia de Shiseki y cols. (51), quienes demostraron que 18q- se correlacionaba con un estadio clínico avanzado ( $p < 0.05$ ) postulando que esta alteración genética podría corresponderse con un fenotipo más agresivo de los CPNM

La familia de proteínas BCL2 juega, como hemos señalado previamente, un papel crucial en la regulación de la apoptosis y consecuentemente, en el desarrollo tumoral, así como en la aparición de resistencias a los diferentes tratamientos.

Tanto su mecanismo de acción como sus implicaciones pronósticas en el CPNM continúan siendo controvertidos a pesar de los múltiples estudios al respecto, por lo que hoy continúa siendo objeto de investigación. En algunos trabajos se ha intentado relacionar su expresión con la respuesta a tratamientos complementarios como radioterapia (210) o quimioterapia (178).

Como señalaba, no se ha clarificado aún cómo la oncoproteína BCL2 interviene en la progresión tumoral y modifica la supervivencia. En 1998, Fontanini y cols. (211) publicaron el control que BCL2 parecía ejercer sobre el factor de crecimiento endotelial relacionado con la angiogénesis. Posteriormente, en pacientes con enfermedad extendida y metástasis extratorácicas, esta molécula se encontró en una pequeña cantidad de metástasis tisulares y se pensó que actuaba como un inhibidor de las metástasis hematógenas (159). Otros autores han concluido que BCL2 no está

involucrada en los procesos de supresión de la apoptosis, sino que probablemente sería independiente de la regulación de la misma (137;143;159;212).

Un meta-análisis de publicaciones entre 1993 y 1999 examinaba la significación pronóstica de BCL2 en el cáncer de pulmón (181). De 21 estudios de CPNM, 10 concluían que la expresión de BCL2 es un marcador de buen pronóstico mientras que uno lo consideraba factor de mal pronóstico. Otro meta-análisis del mismo estudio, que correspondía a su vez a 18 estudios y 2909 pacientes, mostraba también una mejor supervivencia en pacientes cuyos tumores eran BCL2+. Dicho meta-análisis de Martin B. y cols. en el 2003 (181), indicó que la expresión de BCL2 es más frecuente en los carcinomas epidermoides que en otros tipos de CPNM, resultados concordantes con estudios previos nuestros (185) y con los de otros autores (168;178;213-215).

Respecto a nuestros resultados, la mayoría los pacientes en los que hemos valorado BCL2 (54 pacientes de 67, 79,4%) no expresaban esta proteína o lo hacían con escasa intensidad y/o en escasas células. También Radovic S. y cols. (143) solamente evidenciaron expresión de BCL2 en un único caso de carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Por el contrario, en el trabajo de Anton R.C. y cols. (216) sobre 427 pacientes con CPNM (de los cuales 111 carcinomas epidermoides) un 58,6% de los CE expresaban BCL2, aunque no parecía ser factor pronóstico.

En nuestro estudio, de todas las variables analizadas, sólo encontramos correlación entre los casos que perdían el cromosoma 18 (monosomía/q-) y una baja expresión de BCL2 ( $p < 0.001$ ).

Así, no hemos encontrado asociación entre la expresión de BCL2 y el estadio clínico. Sin embargo, algunos trabajos muestran una mayor expresión en estadios tempranos (166;178;183;211) y otros en estadios avanzados (153;167;181). Aún así, la mayor parte de la literatura revisada parece encontrar una relación positiva entre BCL2 y pronóstico, tanto en estadios tempranos (180) como avanzados (182;183).

Al igual que sucedía para KI-67, casi todos los autores han realizado sus estudios sobre el conjunto de los CPNM, siendo los carcinomas epidermoides para muchos de ellos el subtipo histológico más frecuente (3;159;179;184;210) y encontrando en ellos una mayor expresión de esta proteína (3;166-169).

A diferencia de otros autores (165), que correlacionaron una mayor expresión de BCL2 con tumores epidermoides bien diferenciados, no hemos evidenciado tal asociación.

En definitiva, como BCL2 inhibe la apoptosis, su sobre-expresión debería teóricamente favorecer los procesos malignos y resultar en un detrimento de la supervivencia. Sin embargo, algunos trabajos postulan que dicha sobre-expresión implica un mejor pronóstico en general (184) o dentro de determinados subgrupos, como el estadio clínico I (168), I-II (166), I-III (179) o N2, aún siendo un factor pronóstico independiente (186). En otros casos (143;174;175;178;216;217) como el nuestro, no hemos logrado esclarecer su implicación pronóstica y para otros es un factor de mal pronóstico evidente (3;166;169;210;218). También se ha demostrado que esta proteína es un factor de mal pronóstico independiente en determinados subgrupos, tanto en estadio I (169) como III-IV (219) con peor supervivencia en estadios III y IV.

Las razones que expliquen estas diferentes asociaciones son escasamente conocidas, pudiendo deberse a:

- La naturaleza de las muestras tumorales analizadas. En este sentido, Poleri C. y cols. (169) limitaron su estudio a aquellos casos en estadio I frente a Cox G. y cols. (3) y Yoo J. y cols. (179) que incluyeron los estadios I-III.

- Los porcentajes de expresión citoplásmica de BCL2 empleados como criterio para interpretar los resultados como positivos o negativos. Algunos autores han considerado positividad de BCL2 cuando lo expresaban al menos el 20% de las células mientras que otros lo han hecho cuando lo expresaban desde el 5% o incluso el 1% de las mismas (3;165). Por tanto, sería necesario que todos los investigadores emplearan idénticos criterios de “*scoring*” para establecer la correlación entre expresión de BCL2 y supervivencia en el cáncer de pulmón.

Además, se ha demostrado que la expresión de BCL2 se relaciona inversamente con la angiogénesis (211), hallazgo que a su vez apoyaría la hipótesis según la cual dicha proteína implicaría un pronóstico favorable. El estudio de Yoo J. y cols. (179) sin embargo, ponía de manifiesto una asociación significativa entre BCL2+ y VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), hecho que sugiere que otro mecanismo independiente de la vía de la angiogénesis debe influir en el aumento de supervivencia en los pacientes BCL2+. En este sentido, se ha sugerido que la pérdida de la expresión de BCL2 debe representar la des-diferenciación tumoral (3;220).

Con respecto al índice de proliferación KI-67, parece relacionarse con la supervivencia en pacientes con distintas neoplasias, pero los resultados son dispares en el CPNM (179). Aún así, en el intento constante de mejorar el pronóstico de estos tumores, con un diagnóstico más precoz y en base a las diferentes armas terapéuticas, sigue siendo objeto de múltiples estudios. En esta línea, Meert A.P. y cols. (221) valoraron la expresión de KI-67 en biopsias simples y en piezas de resección quirúrgica, con el fin de intentar establecer preoperatoriamente una estrategia terapéutica y definir aquellos grupos de pacientes que más se beneficiarían de un tratamiento adyuvante. Posteriormente, también Meert A.P. y cols. (222) estudiaron esta molécula en lesiones preneoplásicas y tumores pulmonares no microcíticos, encontrando una menor expresión en lesiones de bajo grado, así como su impacto pronóstico adverso en neoplasias.

La mayoría de los autores que han estudiado esta proteína lo han hecho en el conjunto de los CPNM y tan sólo algunos, como Niemiec J. y cols. se han centrado exclusivamente en los carcinomas epidermoides (223), como nosotros. Aún así, este subtipo histológico en muchas ocasiones ha sido el más frecuente y los diferentes autores han expresado sus resultados en función de dichas variedades histológicas (143;224).

Para nosotros, el hallazgo más frecuente ha sido un índice de proliferación bajo, observado en un 58,8% de los pacientes en quienes lo hemos podido valorar, a diferencia de otros autores, quienes han encontrado como más frecuente una expresión media-alta de este marcador en este tipo de tumores (143).

Mientras que en algunos trabajos no encontraron correlación entre KI-67 y el resto de variables analizadas (179), nosotros, al igual que otros autores (143;224) evidenciamos una mayor expresión de KI-67 en tumores pobremente diferenciados. Sin embargo, en diferentes estudios se ha relacionado un mayor índice de proliferación con características clínicas como el hábito tabáquico (224), e histológicas como mayor tamaño (143;223), mayor extensión ganglionar (223), así como con altos niveles de expresión de BCL2 (224).

Tampoco hemos conseguido correlacionar el índice de proliferación con el pronóstico, de acuerdo con los resultados de otros autores (225), aunque estos hallazgos continúan siendo controvertidos. Así, Martin B. y cols. (226) realizaron un meta-análisis de estudios publicados antes del 2003 e identificaron que solamente 15 de los 37 estudios (41%) demostraban un efecto negativo de la sobre-expresión de KI-67 sobre la

supervivencia en pacientes con CPNM. Otros estudios desde el 2002 corroboraban ese impacto negativo de KI-67 (169;227-229) aunque algunos autores como Ludovini V. y cols. (224) demostraron que no era un factor pronóstico independiente del estadio tumoral. Por el contrario, sí era un factor pronóstico independiente para Niemiec J. y cols. (223), quienes en el 2005 valoraron 78 carcinomas epidermoides y describieron que KI-67  $< 0 = 28\%$  (índice de proliferación bajo) tenía un impacto negativo sobre la supervivencia. En uno de los últimos trabajos publicados en el 2008, Saad A.G. y cols. (187) valoraron la expresión de distintos marcadores inmunohistoquímicos en 54 piezas de resección quirúrgica y su relación con el desarrollo de metástasis cerebrales con un seguimiento de 14 años. Demostraron que una alta expresión de KI-67 se relacionaba con un riesgo incrementado de desarrollar metástasis cerebrales y con peor pronóstico.

#### **5.4. Impacto de las alteraciones cromosómicas y del resto de variables anatómo-clínicas en la evolución de la enfermedad**

La falta de técnicas de diagnóstico precoz en el cáncer de pulmón ha contribuido a la ausencia de mejoría en la supervivencia (204;230) puesto que la mayor parte de los casos se diagnostican en estadios avanzados, con enfermedad metastásica regional o a distancia (231;232).

La importancia del estudio de la patología molecular en las neoplasias de pulmón radica en el papel potencial de los marcadores genéticos para la detección precoz, así como para indicar nuevos puntos clave para el desarrollo de nuevos fármacos, vacunas y/o posibles vías de terapia génica (233;234).

Existe un gran número de estudios que han identificado alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón (58;87;204) y a día de hoy continua siendo objeto de múltiples investigaciones (235-237). Como hemos comentado anteriormente, la monosomía del cromosoma 18 o delección 18q-, estudiada en este trabajo, probablemente represente una de las primeras alteraciones cromosómicas que ocurre en la evolución citogenética de un grupo importante de CPNM (invasivos). No obstante, tendría que ser verificado mediante el uso de múltiples sondas dirigidas a diferentes regiones cromosómicas relevantes en la enfermedad que permitan caracterizar cada uno de los clones neoplásicos existentes en el tumor.

Aunque en menor número, en la última década se han empezado a investigar anomalías en lesiones preneoplásicas y en el epitelio bronquial normal en fumadores y no fumadores (238;239). En este sentido, otros autores han detectado la existencia de anomalías a nivel de las regiones cromosómicas 3q28, 5p15 y 8q24 mediante técnicas de citogenética clásica, iFISH e hibridación genómica comparativa en lesiones preinvasivas, sugiriendo que estas alteraciones estaban implicadas en la transformación inicial neoplásica de la célula epitelial (240-244).

En nuestros resultados observamos que los pacientes con polisomías del cromosoma 14 presentaban frecuentemente dos o más clones neoplásicos, mientras que en quienes mostraban monosomía o eran diploides para este cromosoma sólo hemos detectado un clon tumoral. No hemos podido contrastar este hallazgo en la literatura revisada, puesto que la mayoría de los trabajos se limitan a describir las regiones del cromosoma 14 alteradas en este tipo de tumores (106) así como si se encuentra sobre o infraexpresado (44;103). Tampoco hemos encontrado correlación de la alteración numérica o estructural del cromosoma 14 con otras variables anatómico-clínicas, aunque otros autores sí han evidenciado su asociación con el subtipo histológico (no escamoso) (104) o con una tendencia a una mayor frecuencia de monosomías en varones ( $p=0.08$ ) (102). Al igual que en nuestro estudio, otros autores no han podido relacionar la monosomía 14q- con variables como el hábito tabáquico, el grado de diferenciación o el estadio clínico (102). Sin embargo, para Kawasaki T. y cols. (105) la amplificación de 14q11.2 aparecía en tumores pobre y moderadamente diferenciados así como en estadio clínico I-II. Otros trabajos también parecen mostrar la existencia de una asociación clara entre las alteraciones del cromosoma 14 y otras características clínicas de la enfermedad, como la historia de fumador y el estadio clínico (106).

Hasta la fecha, son pocas las características de la enfermedad que han demostrado utilidad para mejorar la supervivencia en pacientes con CPNM. De entre los factores que podrían tener valor pronóstico, merece destacar aquellos relacionados con la biología de la célula neoplásica y su comportamiento a nivel tisular (grado histopatológico del tumor, estado de ploidía de ADN y la tasa proliferativa de las células neoplásicas) (104;245). Así, se ha sugerido que los tumores avanzados (IIIA y IIIB) y aneuploides se asociarían con un peor pronóstico (104). De forma similar, la existencia de células tumorales con una elevada tasa proliferativa implicaría un pronóstico desfavorable de la enfermedad en cuanto a supervivencia libre de recaída (245). En cualquier caso la ploidía del ADN y la tasa proliferativa del tumor,

probablemente son el reflejo directo de las alteraciones genéticas presentes en las células neoplásicas y de las anomalías en su comportamiento a nivel tisular.

Aunque en la información disponible sobre las características citogenéticas de los CPNM es amplia y cada vez más detallada, sigue sin definirse con claridad la posible relación existente entre los marcadores citogenéticos más relevantes y las características clínicas de la enfermedad (246). Se piensa que la pérdida de función de uno o más genes podría intervenir directamente en la ontogenia del tumor (247). Más aún, algunos de estos genes como *EGFR*, *HER2*, *c-KIT*, *P53*, *VEGF*, *FHIT*, *TSLC*, *KRAS*, *DUSP6* (106;204;248) o *BCL2*, ampliamente comentado en este trabajo, se han implicado en el desarrollo y progresión de los CPNM al estar frecuentemente alterados. Sin embargo, en la actualidad queda aún por definir el papel específico que jugaría cada uno de ellos en el proceso de transformación neoplásica de este tipo de tumores.

Desde el punto de vista clínico, se ha analizado extensamente la repercusión de la presencia de monosomía del cromosoma 18 en los CPNM (50;51;76;97;112;145). De acuerdo con los resultados de estos estudios, nosotros en el presente trabajo, hemos constatado que la pérdida de una copia del cromosoma 18 no presentaba una asociación significativa con ninguna característica clínica o biológica de la enfermedad, ni tampoco con la supervivencia.

Por el contrario, hasta el momento de iniciar este trabajo, apenas se habían descrito pérdidas del cromosoma 14 en los CPNM (102;106). A pesar de ello, en nuestra serie detectamos la presencia de pérdidas de este cromosoma en el 35% de los casos, sin estar asociada ninguna de estas deleciones a cariotipos hiperdiploides. Clínicamente, la monosomía del cromosoma 14 se asoció con características adversas de la enfermedad, de las que merece destacar una mayor edad (>70 años) y mayor incidencia de subtipos histológicos avanzados (IIIA y IIB). Además, respecto de la implicación pronóstica, dicha monosomía del cromosoma 14 en célula ancestral tumoral se asoció con una supervivencia a los 3-8 años, significativamente más corta (incidencia de éxitus del 60%) que en los pacientes con tumores diploides o con polisomías para este cromosoma. Estos resultados coinciden con observaciones previas de otros autores, quienes han sugerido que los CPNM con anomalías en el cromosoma 14q estarían asociados con características adversas de la enfermedad, tumores pobre y moderadamente diferenciados y un curso clínico más agresivo (105;106). Kwong y cols. (106) describieron deleciones intersticiales en 14q32 asociadas con la inactivación de los genes supresores *FHIT* y *TSLC1*, involucrados en la progresión de este tipo de tumores.

Por el contrario, otros autores (51) no encontraron correlación entre esta alteración cromosómica y la progresión de la enfermedad. Otras alteraciones cromosómicas implicadas en una menor supervivencia han sido las ganancias 6p11.1-q11 y 8q24.12-q24.13 (58), 8q+ (62) y 12p+ (104).

En el presente trabajo no hemos podido evidenciar la existencia de una asociación clara entre la presencia de alteraciones numéricas para los cromosomas analizados y las características clínicas, biológicas e histopatológicas de la enfermedad analizadas (edad, sexo, hábito tabáquico, grado de diferenciación tumoral, estadio clínico e índice de proliferación celular), salvo las anomalías del cromosoma 14 que tienen un impacto adverso sobre la supervivencia. En definitiva, confirmamos el valor pronóstico independiente de la monosomía 14/14q-, constituyendo este parámetro junto con la edad al diagnóstico y el estadio clínico del tumor la mejor combinación de variables independientes para predecir la supervivencia de los carcinomas epidermoides, incluso en tumores localizados (estadios I y II).

Tampoco hemos encontrado correlación de la alteración numérica o estructural del cromosoma 14 con otras variables anatomo-clínicas, aunque otros autores sí han evidenciado su asociación con otros tipos histológicos de CPNM no escamoso (104) o con una tendencia a una mayor frecuencia de monosomías en varones ( $p=0.08$ ) (102).

Al igual que en nuestro estudio, otros autores no han podido relacionar la monosomía 14q- con variables como el hábito tabáquico, el grado de diferenciación o el estadio clínico (102). Sin embargo, para Kawasaki T. y cols. (105) la amplificación de 14q11.2 aparecía en tumores pobre y moderadamente diferenciados así como en estadio clínico I-II. Otros trabajos también parecen mostrar la existencia de una asociación clara entre las alteraciones del cromosoma 14 y otras características clínicas de la enfermedad, como la historia de fumador y el estadio clínico (106).

## **VI. CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el estudio realizado podemos concluir lo siguiente:

**6.1. En relación con la incidencia de alteraciones numéricas de los cromosomas 14 y 18 en los carcinomas epidermoides de pulmón:**

Los carcinomas epidermoides de pulmón presentan muy frecuentemente (99%) alguna anomalía en las diferentes regiones cromosómicas estudiadas (18p11, 18q21, 14q32), siendo la más frecuente la monosomía/delección -18/18q- (60% de los pacientes), seguida de la monosomía del cromosoma 14 (35% de los casos), con una asociación significativa entre ambas alteraciones.

**6.2. En relación con la heterogeneidad genética y las vías de evolución clonal de los carcinomas epidermoides de pulmón:**

Los carcinomas epidermoides de pulmón son tumores genéticamente heterogéneos, encontrándose mayoritariamente dos clones de células tumorales (47%).

La monosomía del cromosoma 14 se asocia con la presencia de un solo clon tumoral mientras que la polisomía de dicho cromosoma se relaciona con la existencia de dos o más clones neoplásicos.

La vía de evolución clonal establecida en nuestro estudio sería: inicialmente, pérdida/delección del cromosoma 18 -18/18q- aislada (42%) o asociada a pérdida (14q-, 12%) o ganancia (14q+, 9%) del cromosoma 14. Posteriormente, un 17% perderían el cromosoma 14 y el 8% lo ganaría.

**6.3. En relación con la expresión de BCL2 y KI-67/MIB1 en los carcinomas epidermoides de pulmón:**

La expresión proteica de BCL2 en carcinomas epidermoides de pulmón se relaciona significativamente con la pérdida 18q-, región cromosómica donde se ubica el gen que codifica para dicha proteína.

Con respecto a KI-67/MIB1, en la mayoría de los tumores pobremente diferenciados hemos encontrado un índice de proliferación moderado-alto, mientras que los tumores bien o moderadamente diferenciados expresaban un MIB1 bajo.

#### **6.4. En relación con el impacto clínico y pronóstico de las alteraciones cromosómicas en los carcinomas epidermoides de pulmón:**

La monosomía del cromosoma 14 en célula ancestral se asocia con una supervivencia significativamente más corta. También mostraron una menor supervivencia los pacientes en estadio clínico localizado con pérdida del cromosoma 14.

Además del estadio clínico, la pérdida del cromosoma 14 constituye un factor pronóstico adverso en los carcinomas epidermoides de pulmón. La combinación de esta variable con la edad del paciente constituye la mejor combinación de variables pronósticas independientes, relacionándose con una menor supervivencia en el subgrupo de pacientes en estadio clínico localizado.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Cotran R. Robbins: Patología estructural y funcional (6ª ed.). 1999. p. 774.
- (2) Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, et al. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999 Oct 7;18(41):5646-53.
- (3) Cox G, Louise JJ, Andi A, Abrams KR, O'Byrne KJ. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001 Dec;34(3):417-26.
- (4) Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006 Aug;59(8):790-800.
- (5) Korean National Statistical Office. Korean National Statistical Office . 2001.
- (6) Hernández Hernández JR. Epidemiología del cáncer de pulmón en España. Izarzugaza Lizarraga MI., editor. 5-18. 10-1-2002. En: López Encuentra A, Llobregat Poyán N, editores. *Cáncer de pulmón. Monografía Neumomadrid.*, Madrid: Ediciones Doyma, S.L..
- (7) Mugüenza D. Factores Biológicos Pronósticos en el CBNM. Utilidad de los marcadores tumorales en el cáncer de pulmón no microcítico [1]. 1994.
- (8) Cayuela Domínguez A. Mortalidad por cáncer de pulmón en Andalucía (1975-2000). *Arch Bronconeumol.* 39, 491-495. 2003.
- (9) Banegas JR . Mortalidad atribuible al tabaquismo en España en 1998. *Med Clin* 117, 692-694. 2001.
- (10) Newcomb PA, Carbone PP. The health consequences of smoking. *Cancer. Med Clin North Am* 1992 Mar;76(2):305-31.
- (11) Yuan J, Ma J, Zheng H, Shi T, Sun W, Zhang Q, et al. Overexpression of OLC1, cigarette smoke, and human lung tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 2008 Nov 19;100(22):1592-605.
- (12) Aronchick J. Lung cancer: Epidemiology and risk Factors. *Seminars in Roentgenology*, 25, 5-11. 1990.
- (13) Atlanta G. Cancer Facts and Figures 2003. American Cancer Society . 2003.
- (14) Atlanta. Targeting Tobacco Use: The Nation's Leading Cause of Death. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2003. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2003. 2003.

- (15) Lee EW, D'Alonzo GE. Cigarette Smoking. Nicotine addiction and its pharmacologic treatment. *Arch.intern.med*, 153, 34-48. 1993.
- (16) Blot WJ, Fraumeni JF. Arsenical air pollution and lung cancer. *Lancet*, 2, 142-144. 1975.
- (17) Lee Am, Fraumeni JF. Arsenic and respiratory cancer in man: An occupational Study. *JNCI*, 42, 1045-1052. 1969.
- (18) Doll R. Cancers of the lung and nasal sinuses in Nickel Workers. *Br.J Cancer* 24, 623-632. 1970.
- (19) Kuschner M, Laskin S, Drew RT, Cappiello V, Nelson N. The inhalation carcinogenicity of alpha Halo-ethers.III. *Arch Environ Health*, 30, 73-77. 1975.
- (20) Radford EP, Renard KG. Lung cancer in Swedish iron miners exposed to radon daughters. *N.Engl.J.Med*, 310, 1485-1494. 1984.
- (21) Frank AL. Occupational lung in cancer. Harris CC (ed), *Pathogenesis and therapy of lung cancer*. 25-51. 1978.
- (22) Yamada A. Phato-anatomical studies on respiratory cancers developed in workers with occupational exposure to mutard gas. *Hiroshima med J*, 7, 719-761. 1959.
- (23) Thomas TL, Stewart PA. Mortality from lung cancer and respiratory disease among pottery workers exposed to silica and talc. *Am.J Epidemiolol*, 125, 35-43. 1987.
- (24) Travis W.D. World Health Organization Classification of Lung and Pleural Tumors, 3<sup>rd</sup> edn, Springer-Verlag, Berlín. Colby T.V. and Conin B., editor. 1999. Springer-Verlag, Berlín.
- (25) Farreras Rozman. Tumores broncopulmonares primarios malignos. 13 ed. 1998. p. 778-86.
- (26) Lopez-Malpartida AV, Ludena MD, Varela G, Pichel JG. Differential ErbB receptor expression and intracellular signaling activity in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Lung Cancer* 2008 Nov 27.
- (27) Lukeis R, Ball D, Irving L, Garson OM, Hasthorpe S. Chromosome abnormalities in non-small cell lung cancer pleural effusions: cytogenetic indicators of disease subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 1993 Dec;8(4):262-9.
- (28) Feder M, Siegfried JM, Balschem A, Litwin S, Keller SM, Liu Z, et al. Clinical relevance of chromosome abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1998 Apr 1;102(1):25-31.

- (29) Testa JR, Liu Z, Feder M, Bell DW, Balsara B, Cheng JQ, et al. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997 May;95(1):20-32.
- (30) Siegfried JM, Hunt JD, Zhou JY, Keller SM, Testa JR. Cytogenetic abnormalities in non-small cell lung carcinoma: similarity of findings in conventional and feeder cell layer cultures. *Genes Chromosomes Cancer* 1993 Jan;6(1):30-8.
- (31) Rabbitts P, Douglas J, Daly M, Sundaresan V, Fox B, Haselton P, et al. Frequency and extent of allelic loss in the short arm of chromosome 3 in nonsmall-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1989 Sep;1(1):95-105.
- (32) Miura I, Siegfried JM, Resau J, Keller SM, Zhou JY, Testa JR. Chromosome alterations in 21 non-small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1990 Nov;2(4):328-38.
- (33) Maturri L, Lavezzi AM. Recurrent chromosome alterations in non-small cell lung cancer. *Eur J Histochem* 1994;38(1):53-8.
- (34) Sundareshan TS, Augustus M. Cytogenetics of non-small cell lung cancer: simple technique for obtaining high quality chromosomes by fine needle aspirate cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 1996 Oct 1;91(1):53-60.
- (35) Varella-Garcia M, Gemmill RM, Rabenhorst SH, Lotto A, Drabkin HA, Archer PA, et al. Chromosomal duplication accompanies allelic loss in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1998 Oct 15;58(20):4701-7.
- (36) Berker-Karauzum S, Luleci G, Ozbilim G, Erdogan A, Kuzucu A, Demircan A. Cytogenetic findings in thirty lung carcinoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1998 Jan 15;100(2):114-23.
- (37) Speicher MR, Petersen S, Uhrig S, Jentsch I, Fauth C, Eils R, et al. Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding. *Lab Invest* 2000 Jul;80(7):1031-41.
- (38) Luk C, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F, Squire JA. Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001 Mar;125(2):87-99.
- (39) Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Br J Cancer* 2004 Feb 23;90(4):900-5.
- (40) Kume M, Taguchi T, Okada H, Anayama T, Tominaga A, Shuin T, et al. Establishment and molecular cytogenetic characterization of non-small cell lung cancer cell line KU-T1 by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and chromosome microdissection. *Cancer Genet Cytogenet* 2007 Dec;179(2):93-101.

- (41) Shen H, Zhu Y, Wu YJ, Qiu HR, Shu YQ. Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2008 Mar;181(2):100-7.
- (42) Fountain JW, Karayiorgou M, Taruscio D, Graw SL, Buckler AJ, Ward DC, et al. Genetic and physical map of the interferon region on chromosome 9p. *Genomics* 1992 Sep;14(1):105-12.
- (43) Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Shin SY, Kim JM, et al. High frequency of genetic alterations in non-small cell lung cancer detected by multi-target fluorescence in situ hybridization. *J Korean Med Sci* 2007 Sep;22 Suppl:S47-S51.
- (44) Shen H, Gao W, Wu YJ, Qiu HR, Shu YQ. Multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization reveal molecular events in lung adenocarcinomas and squamous cell lung carcinomas. *Biomed Pharmacother* 2008 Sep 16.
- (45) Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, Kennedy T, Hilliker CE, Jr., Hahner L, et al. Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors. *Cancer Res* 1997 Apr 1;57(7):1344-52.
- (46) Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2689-92.
- (47) Garinis GA, Gorgoulis VG, Mariatos G, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Association of allelic loss at the *FHIT* locus and p53 alterations with tumour kinetics and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). *J Pathol* 2001 Jan;193(1):55-65.
- (48) Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, et al. Inactivation of *hMLH1* and *hMSH2* by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest* 2003 Mar;111(6):887-95.
- (49) Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004 Sep;57(9):965-9.
- (50) Tsuchiya E, Nakamura Y, Weng SY, Nakagawa K, Tsuchiya S, Sugano H, et al. Allelotype of non-small cell lung carcinoma-comparison between loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992 May 1;52(9):2478-81.
- (51) Shiseki M, Kohno T, Nishikawa R, Sameshima Y, Mizoguchi H, Yokota J. Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1994 Nov 1;54(21):5643-8.

- (52) Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 1999 Apr 15;59(8):1973-9.
- (53) Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Koizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, et al. Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Aug;7(4):197-203.
- (54) Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2001 Apr;27(4):427-30.
- (55) Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Dec;84(24):9252-6.
- (56) Mori N, Yokota J, Oshimura M, Cavenee WK, Mizoguchi H, Noguchi M, et al. Concordant deletions of chromosome 3p and loss of heterozygosity for chromosomes 13 and 17 in small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1989 Sep 15;49(18):5130-5.
- (57) Garnis C, Davies JJ, Buys TP, Tsao MS, MacAulay C, Lam S, et al. Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. *Oncogene* 2005 Jul 14;24(30):4806-12.
- (58) Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Shin SY, Kim JM, et al. High frequency of genetic alterations in non-small cell lung cancer detected by multi-target fluorescence in situ hybridization. *J Korean Med Sci* 2007 Sep;22 Suppl:S47-S51.
- (59) de JC, Iniesta P, Cruces J, Sanchez A, Massa MJ, Gonzalez-Quevedo R, et al. DNA amplification on chromosome 6p12 in non small cell lung cancer detected by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1999 Aug 20;84(4):344-9.
- (60) Lee JS, Hong WK. Prognostic factors in lung cancer. *N Engl J Med* 1992 Jul 2;327(1):47-8.
- (61) Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Weiss H, Bell WC, Heimbürger DC, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 2002 Mar;8(3):734-44.
- (62) Kubokura H, Koizumi K, Yamamoto M, Tanaka S. Chromosome 8 copy numbers and the c-myc gene amplification in non-small cell lung cancer. Analysis by interphase cytogenetics. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1999 Apr;66(2):107-12.

- (63) Pei J, Balsara BR, Li W, Litwin S, Gabrielson E, Feder M, et al. Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 Jul;31(3):282-7.
- (64) Lee KJ, Lee MS, Kim JO, Kim SY. A comparative study on aberrations of chromosome 17 and proliferating cell fraction in lung cancer. *J Korean Med Sci* 1993 Aug;8(4):271-80.
- (65) 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 Apr 1;60(7):1949-60.
- (66) Khan S, Coulson JM, Woll PJ. Genetic abnormalities in plasma DNA of patients with lung cancer and other respiratory diseases. *Int J Cancer* 2004 Jul 20;110(6):891-5.
- (67) Schayek H, Krupsky M, Yaron P, Yellin A, Simansky DA, Friedman E. Genetic analyses of non-small cell lung cancer in Jewish Israeli patients. *Isr Med Assoc J* 2006 Mar;8(3):159-63.
- (68) Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004 Nov 18;432(7015):338-41.
- (69) Mundle SD, Sokolova I. Clinical implications of advanced molecular cytogenetics in cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2004 Jan;4(1):71-81.
- (70) Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA. Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000 Jan;12(1):62-7.
- (71) Sandberg AA. Chromosomes as markers in human cancer. *Int Adv Surg Oncol* 1981;4:311-36.
- (72) Sandberg AA. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. *Mutat Res* 1991 Apr;247(2):231-40.
- (73) Sayagues JM, Tabernero MD, Maillo A, Espinosa A, Rasillo A, Diaz P, et al. Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn* 2004 Nov;6(4):316-25.
- (74) Sayagues JM, Tabernero MD, Maillo A, Diaz P, Rasillo A, Bortoluci A, et al. Incidence of numerical chromosome aberrations in meningioma tumors as revealed by fluorescence in situ hybridization using 10 chromosome-specific probes. *Cytometry* 2002 Jun 15;50(3):153-9.
- (75) Field JK, Neville EM, Stewart MP, Swift A, Liloglou T, Risk JM, et al. Fractional allele loss data indicate distinct genetic populations in the development of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996 Dec;74(12):1968-74.

- (76) Shiseki M, Kohno T, Adachi J, Okazaki T, Otsuka T, Mizoguchi H, et al. Comparative allelotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996 Oct;17(2):71-7.
- (77) Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 19;1378(1):F21-F59.
- (78) Braithwaite KL, Rabbitts PH. Multi-step evolution of lung cancer. *Semin Cancer Biol* 1999 Aug;9(4):255-65.
- (79) L.Piñero Amigo. Biología molecular y cáncer de pulmón. *Sogapar.org/pneuma* 3, 135-137. 2005.
- (80) I.Zudaire. Desarrollo de la técnica de FICTION como nueva herramienta para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 25[3], 305-317. 2002.
- (81) Zöchbauer-Müller S. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 64, 681-708. 2002.
- (82) Caballero OL. Loss of chromosome arms 3p and 9p and inactivation of P16 (INK4a) in normal epithelium of patients with primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 32, 119-125. 2001.
- (83) Uematsu K, Yoshimura A, Gemma A, Mochimaru H, Hosoya Y, Kunugi S, et al. Aberrations in the fragile histidine triad (*FHIT*) gene in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 2001 Dec 1;61(23):8527-33.
- (84) Oh JJ, West AR, Fishbein MC, Slamon DJ. A candidate tumor suppressor gene, H37, from the human lung cancer tumor suppressor locus 3p21.3. *Cancer Res* 2002 Jun 1;62(11):3207-13.
- (85) Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res* 2002 May 1;62(9):2637-43.
- (86) Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene *RASSF1A* is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001 Jun 14;20(27):3563-7.
- (87) Hilbe W, Dirnhofer S, Greil R, Woll E. Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 2004 Oct;13(5):425-36.
- (88) Chung GT, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbitts PH. Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene* 1995 Dec 21;11(12):2591-8.
- (89) Chung GT, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbitts PH. Clonal evolution of lung tumors. *Cancer Res* 1996 Apr 1;56(7):1609-14.

- (90) 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 Nov 15;55(22):5133-9.
- (91) Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999 Aug;188(4):351-60.
- (92) Kratzke RA, Greatens TM, Rubins JB, Maddaus MA, Niewoehner DE, Niehans GA, et al. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 1996 Aug 1;56(15):3415-20.
- (93) Guzman LM, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, Castillo D, Corvalan A, et al. High frequency of p16 promoter methylation in non-small cell lung carcinomas from Chile. *Biol Res* 2007;40(3):365-72.
- (94) Huang CI, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Miyake M. p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2000 Jan;82(2):374-80.
- (95) Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non-small cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res* 2002 Oct;93(10):1107-13.
- (96) Lu YJ, Dong XY, Guo SP, Zhang RG, Ke Y, Zhang LZ, et al. 2q-, a non-random chromosomal abnormality in human non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 1996 Aug;17(8):1589-93.
- (97) Tomizawa Y, Adachi J, Kohno T, Hamada K, Saito R, Noguchi M, et al. Prognostic significance of allelic imbalances on chromosome 9p in stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 May;5(5):1139-46.
- (98) Gorgoulis VG, Kotsinas A, Zacharatos P, Mariatos G, Liloglou T, Tsoi E, et al. Association of allelic imbalance at locus D13S171 (BRCA2) and p53 alterations with tumor kinetics and chromosomal instability (aneuploidy) in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2000 Nov 1;89(9):1933-45.
- (99) Zojer N, Dekan G, Ackermann J, Fiegl M, Kaufmann H, Drach J, et al. Aneuploidy of chromosome 7 can be detected in invasive lung cancer and associated premalignant lesions of the lung by fluorescence in situ hybridisation. *Lung Cancer* 2000 Jun;28(3):225-35.
- (100) Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008 Apr 1;182(1):1-11.
- (101) Tran Y, Benbatoul K, Gorse K, Rempel S, Futreal A, Green M, et al. Novel regions of allelic deletion on chromosome 18p in tumors of the lung, brain and breast. *Oncogene* 1998 Dec 31;17(26):3499-505.

- (102) Abujiang P, Mori TJ, Takahashi T, Tanaka F, Kasyu I, Hitomi S, et al. Loss of heterozygosity (LOH) at 17q and 14q in human lung cancers. *Oncogene* 1998 Dec 10;17(23):3029-33.
- (103) Xiao W, Pacyna-Gengelbach M, Schluns K, An Q, Gao Y, Cheng S, et al. Differentially expressed genes associated with human lung cancer. *Oncol Rep* 2005 Jul;14(1):229-34.
- (104) Yakut T, Schulten HJ, Demir A, Frank D, Danner B, Egeli U, et al. Assessment of molecular events in squamous and non-squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2006 Dec;54(3):293-301.
- (105) Kawasaki T, Yokoi S, Tsuda H, Izumi H, Kozaki K, Aida S, et al. BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 2007 Jul;98(7):1070-7.
- (106) Kwong FM, Wong PS, Lung ML. Genetic alterations detected on chromosomes 13 and 14 in Chinese non-small cell lung carcinomas. *Cancer Lett* 2003 Mar 31;192(2):189-98.
- (107) Bader S, Walker M, McQueen HA, Sellar R, Oei E, Wopereis S, et al. MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene* 2003 May 29;22(22):3506-10.
- (108) Nagatake M, Osada H, Kondo M, Uchida K, Nishio M, Shimokata K, et al. Aberrant hypermethylation at the bcl-2 locus at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 1996 Apr 15;56(8):1886-91.
- (109) Smith SL, Watson SG, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene* 2003 Nov 27;22(54):8677-87.
- (110) Kohno T, Sato T, Takakura S, Takei K, Inoue K, Nishioka M, et al. Mutation and expression of the DCC gene in human lung cancer. *Neoplasia* 2000 Jul;2(4):300-5.
- (111) Nagatake M, Takagi Y, Osada H, Uchida K, Mitsudomi T, Saji S, et al. Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 1996 Jun 15;56(12):2718-20.
- (112) Takei K, Kohno T, Hamada K, Takita J, Noguchi M, Matsuno Y, et al. A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res* 1998 Aug 15;58(16):3700-5.
- (113) Wang J, Tai LS, Tzang CH, Fong WF, Guan XY, Yang M. 1p31, 7q21 and 18q21 chromosomal aberrations and candidate genes in acquired vinblastine resistance of human cervical carcinoma KB cells. *Oncol Rep* 2008 May;19(5):1155-64.
- (114) Furlan D, Bernasconi B, Uccella S, Cerutti R, Carnevali I, Capella C. Allelotypes and fluorescence in situ hybridization profiles of poorly

- differentiated endocrine carcinomas of different sites. *Clin Cancer Res* 2005 Mar 1;11(5):1765-75.
- (115) Rodriguez E, Sreekantaiah C, Chaganti RS. Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res* 1994 Jul 1;54(13):3398-406.
- (116) Hahn SA, Seymour AB, Hoque AT, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, et al. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 1995 Oct 15;55(20):4670-5.
- (117) Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, et al. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 1995 Nov 2;11(9):1829-34.
- (118) Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989 Apr 14;244(4901):207-11.
- (119) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- (120) Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996 Jul;13(3):343-6.
- (121) Jen J. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*.1994 Jul 28, 331(4):213-21.
- (122) Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer* 1998 Aug 21;79(4):390-5.
- (123) Martínez-López E. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998 Jun 1, 114(6): 1330-32.
- (124) Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*DCC*) gene. *Nature* 1997 Apr 24;386(6627):796-804.
- (125) Fabre M, Martin M, Ulloa F, Real FX. In vitro analysis of the role of *DCC* in mucus-secreting intestinal differentiation. *Int J Cancer* 1999 May 31;81(5):799-807.
- (126) Uchida K, Nagatake M, Osada H, Yatabe Y, Kondo M, Mitsudomi T, et al. Somatic in vivo alterations of the *JVI8-1* gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 1996 Dec 15;56(24):5583-5.
- (127) Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, et al. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001 Oct;195(3):321-6.

- (128) Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001 Jun;34(4):303-7.
- (129) Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, et al. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001 Nov;23(11):962-6.
- (130) Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Clinical significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes in "node-negative" breast cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 2002 Jun;93(6):695-8.
- (131) Sood AK, Fletcher MS. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002 Sept 1; 8(9): 2924-32.
- (132) Pierson CR, McGowen R, Grignon D, Sakr W, Dey J, Sheng S. Maspin is up-regulated in premalignant prostate epithelia. *Prostate* 2002 Dec 1;53(4):255-62.
- (133) Hong JH, Lee E. Antisense Bcl2 oligonucleotide in cisplatin-resistant bladder cancer cell lines. *BJU Int*. 2002 Jul 1; 90(1): 113-7. 1-7-2002.
- (134) Frankel AE, Schuster MW, Jurcic JG. Novel therapeutics for chemotherapy-resistant acute myeloid leukaemia. *BioDrugs* 2001;15(1):55-71.
- (135) Kim PK, Mahidhara R, Seol DW. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2001 Oct;4(5):293-6.
- (136) Schlegel J, Guneyesu S, Mennel HD. Expression of the genes of methyl-binding domain proteins in human gliomas. *Oncol Rep* 2002 Mar;9(2):393-5.
- (137) Pezzella F. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *New Engl.J.Med* 1993; 329: 690-694.
- (138) Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999 Feb;79(5-6):952-8.
- (139) Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, et al. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2488-91.
- (140) 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 Apr;113(4):1091-4.
- (141) Caligo MA, Ghimenti C, Marchetti A, Lonobile A, Buttitta F, Pellegrini S, et al. Microsatellite alterations and p53, TGFbetaRII, IGF1R and BAX mutations in sporadic non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998 Nov 23;78(5):606-9.

- (142) Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995 Jan 1;55(1):28-30.
- (143) Radovic S, Babic M, Doric M, Hukic A, Kuskunovic S, Hadzismajlovic A, et al. Non-small cell lung carcinoma: cyclin D1, bcl-2, p53, Ki-67 and HER-2 proteins expression in resected tumors. *Bosn J Basic Med Sci* 2007 Aug;7(3):205-11.
- (144) Mountain CF. The evolution of the surgical treatment of lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 2000 Feb;10(1):83-104.
- (145) Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Tumor progression and loss of heterozygosity at 5q and 18q in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995 Jan 15;55(2):220-3.
- (146) Osaki T, Oyama T, Inoue M, Gu CD, Kodate M, Aikawa M, et al. Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lung cancer. Prognostic implications. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Sep;49(9):545-51.
- (147) Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994 Feb 1;54(3):640-2.
- (148) Figlin RA, Piantadosi S, Feld R. Intracranial recurrence of carcinoma after complete surgical resection of stage I, II, and III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1988 May 19;318(20):1300-5.
- (149) Leek R.D. *Bcl-2* in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor- positive, epidermal growth factor receptor- negative tumours and *in situ* cancer. *Br.J.Cancer* 1994; 69: 135-9.
- (150) Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994 Apr 6;86(7):499-504.
- (151) Pilotti S, Collini P, Rilke F, Cattoretti G, Del BR, Pierotti MA. Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *J Pathol* 1994 Apr;172(4):337-42.
- (152) Colombel M. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am .J.Pathol.* 1993; 143: 390-400.
- (153) Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, et al. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1995 May;71(5):1003-7.
- (154) Bhargava V. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994; 145: 535-40.

- (155) Joensuu H. *Bcl-2* protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145: 1191-8.
- (156) Lipponen P. Apoptosis suppressing protein *bcl-2* is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995; 177: 49-55.
- (157) Hellemans P. Prognostic value of *bcl-2* expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 354-60.
- (158) Gasparini G. Expression of *bcl-2* protein predicts efficacy of adjuvant treatment in operable node-positive breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.
- (159) Yaren A, Oztop I, Kargi A, Ulukus C, Onen A, Sanli A, et al. *Bax*, *bcl-2* and *c-kit* expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. *Int J Clin Pract* 2006 Jun;60(6):675-82.
- (160) Cagnur Ulukus E. Survivin expression in Non-small-cell Lung Carcinomas: Correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15 (1):31-7.
- (161) Bria E, Cuppone F, Ciccarese M, Nistico C, Facciolo F, Milella M, et al. Weekly docetaxel as second line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2006 Dec;32(8):583-7.
- (162) Kilic A, Schuchert MJ, Luketich JD, Landreneau RJ, El-Hefnawy T. Efficacy of Signal Pathway Inhibitors Alone and in Combination With Cisplatin Varies Between Human Non-Small Cell Lung Cancer Lines. *J Surg Res* 2009 Jun 1;154(1):9-12
- (163) Hockenbery DM. *Bcl2* protein topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-5.
- (164) Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 2003;54:73-87.
- (165) Ritter JH, Dresler CM, Wick MR. Expression of *bcl-2* protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 1995 Nov;26(11):1227-32.
- (166) Ohsaki Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Matsui H, Hirata S, Miyokawa N, et al. *bcl-2* and *p53* protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time. *Clin Cancer Res* 1996 May;2(5):915-20.
- (167) Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Nakamori S, Tateishi R. *bcl-2* oncoprotein in surgically resected non-small cell lung cancer: possibly

- favorable prognostic factor in association with low incidence of distant metastasis. *J Surg Oncol* 1997 Jan;64(1):48-54.
- (168) Apolinario RM, van d, V, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Dingemans AM, et al. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997 Jun;15(6):2456-66.
- (169) Poleri C, Morero JL, Nieva B, Vazquez MF, Rodriguez C, de TE, et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest* 2003 Jun;123(6):1858-67.
- (170) Liu H, Zhang T, Li X, Huang J, Wu B, Huang X, et al. Predictive value of MMP-7 expression for response to chemotherapy and survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008 Sep 23.
- (171) Kaiser U, Schilli M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E, et al. Expression of bcl-2--protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1996 Aug;15(1):31-40.
- (172) Yilmaz A, Savas I, Dizbay SS, Gungor A, Kaya A, Serinsoz E, et al. Distribution of Bcl-2 gene expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer. *Tuberk Toraks* 2005;53(4):323-9.
- (173) Walker C. R. Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br.J.Cancer* 1995; 72: 164-9.
- (174) Kalomenidis I, Orphanidou D, Papamichalis G, Vassilakopoulos T, Scorilas A, Rasidakis A, et al. Combined expression of p53, Bcl-2, and p21WAF-1 proteins in lung cancer and premalignant lesions: association with clinical characteristics. *Lung* 2001;179(5):265-78.
- (175) Lai RS, Wang JS, Hsu HK, Chang HC, Lin CH, Lin MH. Prognostic evaluation of the expression of p53 and bcl-2 oncoproteins in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002 Oct;32(10):393-7.
- (176) Bubb R.S. Association of Ki-67,p53 and bcl-2 expression of the primary non-small-cell lung cancer lesion with brain metastatic lesion. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 2001; 53: 1216-24.
- (177) Rigau V, Molina TJ, Chaffaud C, Huchon G, Audouin J, Chevret S, et al. Blood vessel invasion in resected non small cell lung carcinomas is predictive of metastatic occurrence. *Lung Cancer* 2002 Nov;38(2):169-76.
- (178) Krug LM, Miller VA, Filippa DA, Venkatraman E, Ng KK, Kris MG. Bcl-2 and bax expression in advanced non-small cell lung cancer: lack of correlation with chemotherapy response or survival in patients treated with docetaxel plus vinorelbine. *Lung Cancer* 2003 Feb;39(2):139-43.

- (179) Yoo J, Jung JH, Lee MA, Seo KJ, Shim BY, Kim SH, et al. Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis. *J Korean Med Sci* 2007 Apr;22(2):318-25.
- (180) Kren L, Brazdil J, Hermanova M, Goncharuk VN, Kallakury BV, Kaur P, et al. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004 Mar;12(1):44-9.
- (181) Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2003 Jul 7; 89(1):55-64.
- (182) Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, Nagayasu T. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2004 May; 24(3b):1925-8.
- (183) Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004 Oct;46(1):77-85.
- (184) Yilmaz A, Savas I, Dizbay SS, Gungor A, Kaya A, Serinsoz E, et al. Distribution of Bcl-2 gene expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer. *Tuberk Toraks* 2005; 53(4):323-9.
- (185) Montejo Maillo B. Valoración de la expresión de BCL2 y Ki-67 en el cáncer de pulmón no microcítico. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca. 2003 Jun; 1-114.
- (186) Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T. Prognostic significance of bcl-2 expression in resected pN2 non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003 Oct;29(8):654-7.
- (187) Saad AG, Yeap BY, Thunnissen FB, Pinkus GS, Pinkus JL, Loda M, et al. Immunohistochemical markers associated with brain metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2008 Oct 15;113(8):2129-38.
- (188) Scagliotti GV. Prognostic significance of Ki-67 labelling in resected non small cell lung cancer. *Eur.J.Canc* 1993; 29: 363-5.
- (189) Pence J. Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Arch.Surg* 1993; 128: 1382-90.
- (190) Soomro IN. Predicting prognosis in lung cancer: use of proliferation marker, Ki-67 monoclonal antibody. *J Pak Med Assoc* 1998; 48: 66-9.

- (191) Hiroyuki Hayash N. High cyclin E and low p27/Kip 1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2001; 34: 59-65.
- (192) Soini Y. Expression of antioxidant enzymes in bronchial metaplastic and dysplastic epithelium. *Lung Cancer* 2003; 39: 15-22.
- (193) Vesselle H, Salskov A, Turcotte E, Wiens L, Schmidt R, Jordan CD, et al. Relationship between non-small cell lung cancer FDG uptake at PET, tumor histology, and Ki-67 proliferation index. *J Thorac Oncol* 2008 Sep; 3(9):971-8.
- (194) Taberero MD. Hibridación in situ (HIS) por métodos no radiactivos para la detección de alteraciones numéricas de cromosomas. *Patología* 1993; 26: 103-11.
- (195) Muller S. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum.Genet.* 1997; 100: 271-8.
- (196) Chen Z. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63: 62-9.
- (197) Taberero MD. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 1996; 149: 153-61.
- (198) Ozaki S. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol* 1999; 41: 167-74.
- (199) Kallioniemi A. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-21.
- (200) Garcia RL. Analysis of proliferative Grade Using Anti-PCNA/Ciclyn Monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J of Pathol* 1989; 134(4): 733-9.
- (201) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.
- (202) Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G. Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Dec 1;11(23):8288-94.
- (203) Taberero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, Najera L, Garcia-Isidoro M, Perez-Simon JA, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 1996 Jul;149(1):153-61.

- (204) Sato M. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007 Apr; 2(4), 327-43. 1-4-2007.
- (205) Huang YT, Heist RS, Chirieac LR, Lin X, Skaug V, Zienolddiny S, et al. Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009 Jun 1;27(16):2660-7.
- (206) Wrage M, Ruosaari S, Eijk PP, Kaifi JT, Hollmen J, Yekebas EF, et al. Genomic profiles associated with early micrometastasis in lung cancer: relevance of 4q deletion. *Clin Cancer Res* 2009 Mar 1;15(5):1566-74.
- (207) Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; 46: 2203-7.
- (208) Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000 Aug 16;92(16):1303-7.
- (209) Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Jr., Godleski J, Herndon JE, Shieh DB, Richards W, et al. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications. *J Clin Oncol* 1998 Jul;16(7):2468-77.
- (210) Hwang JH, Lim SC, Kim YC, Park KO, Ahn SJ, Chung WK. Apoptosis and bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001 May 1;50(1):13-8.
- (211) Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998 Apr;34(5):718-23.
- (212) Laudanski J, Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2001 Apr;17(4):660-6.
- (213) Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macherey RS, Shackney SE, et al. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 2002 Jan;33(1):105-10.
- (214) Hanaoka T, Nakayama J, Haniuda M, Sato TA. Immunohistochemical demonstration of apoptosis-regulated proteins, Bcl-2 and Bax, in resected non-small-cell lung cancers. *Int J Clin Oncol* 2002 Jun;7(3):152-8.
- (215) Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004 Oct;46(1):77-85.
- (216) Anton RC, Brown RW, Younes M, Gondo MM, Stephenson MA, Cagle PT. Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol* 1997 Sep;28(9):1079-82.

- (217) Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997 Aug;15(8):2858-65.
- (218) Silvestrini R, Costa A, Lequaglie C, Mochen C, Veneroni S, Leutner M, et al. Bcl-2 protein and prognosis in patients with potentially curable non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch* 1998 May;432(5):441-4.
- (219) Liu H, Zhang T, Li X, Huang J, Wu B, Huang X, et al. Predictive value of MMP-7 expression for response to chemotherapy and survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008 Nov;99(11):2185-92.
- (220) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Whitehouse RM, Talbot DC, Gatter KC, et al. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1997 Dec 19;74(6):565-70.
- (221) Meert AP, Martin B, Verdebout JM, Paesmans M, Berghmans T, Ninane V, et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004 Jun;44(3):295-301.
- (222) Meert AP, Martin B, Verdebout JM, Feoli F, Mascaux C, Ninane V, et al. EGFR, c-erbB-2 and ki-67 in NSCLC and preneoplastic bronchial lesions. *Anticancer Res* 2006 Jan;26(1A):135-8.
- (223) Niemiec J, Kolodziejwski L, Dyczek S. EGFR LI and Ki-67 LI are independent prognostic parameters influencing survivals of surgically treated squamous cell lung cancer patients. *Neoplasma* 2005;52(3):231-7.
- (224) Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, Floriani I, Rulli E, Di CL, et al. Biological markers and DNA flow cytometric analysis in radically resected patients with non-small cell lung cancer. A study of the Perugia Multidisciplinary Team for Thoracic Tumors. *Tumori* 2008 May;94(3):398-405.
- (225) Szelachowska J, Jelen M. Laminin, Her2/neu and Ki-67 as prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49:256-61.
- (226) Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2004 Dec 13;91(12):2018-25.
- (227) Huang C, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Kameyama K, Ishikawa S, et al. Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 2005 Apr 11;92(7):1231-9.
- (228) Takahashi S, Kamata Y, Tamo W, Koyanagi M, Hatanaka R, Yamada Y, et al. Relationship between postoperative recurrence and expression of cyclin E, p27, and Ki-67 in non-small cell lung cancer without lymph node metastases. *Int J Clin Oncol* 2002 Dec;7(6):349-55.

- (229) Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Shimamura F, Iizasa T, et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003 Jun;75(6):1727-32.
- (230) Rescan PY. Identification of a fibroblast growth factor 6 (FGF6) gene in a non-mammalian vertebrate: continuous expression of FGF6 accompanies muscle fiber hyperplasia. *Biochim Biophys Acta* 1998 Dec 22;1443(3):305-14.
- (231) Borczuk AC, Toonkel RL, Powell CA. Genomics of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009 Apr 15;6(2):152-8.
- (232) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006 Mar;56(2):106-30.
- (233) Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications. *Future Oncol* 2005 Feb;1(1):79-92.
- (234) Minna JD, Fong K, Zochbauer-Muller S, Gazdar AF. Molecular pathogenesis of lung cancer and potential translational applications. *Cancer J* 2002 May;8 Suppl 1:S41-S46.
- (235) Shibukawa K. High incidence of chromosomal abnormalities at 1p36 and 9p21 in early-stage central type squamous cell carcinoma and squamous dysplasia of bronchus detected by autofluorescence bronchoscopy. *Oncol Rep* 2009 Jul; 22(1): 81-7.
- (236) Wu C, Hu Z, Yu D, Huang L, Jin G, Liang J, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations. *Cancer Res* 2009 Jun 15;69(12):5065-72.
- (237) Berger AH, Niki M, Morotti A, Taylor BS, Socci ND, Viale A, et al. Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat Genet* 2010 Feb 7.
- (238) Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol* 2006;1:331-48.
- (239) Capkova L. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer* 2007 Jun;109(11): 2299-307.
- (240) Varella-Garcia M, Chen L, Powell RL, Hirsch FR, Kennedy TC, Keith R, et al. Spectral karyotyping detects chromosome damage in bronchial cells of smokers and patients with cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Sep 1;176(5):505-12.
- (241) Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 2003 Nov 1;63(21):7113-21.
- (242) Jonsson S, Varella-Garcia M, Miller YE, Wolf HJ, Byers T, Braudrick S, et al. Chromosomal aneusomy in bronchial high-grade lesions is associated with invasive lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Feb 1;177(3):342-7.

- (243) Garnis C, Coe BP, Ishkanian A, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Novel regions of amplification on 8q distinct from the MYC locus and frequently altered in oral dysplasia and cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004 Jan;39(1):93-8.
- (244) Garnis C, MacAulay C, Lam S, Lam W. Genetic alteration on 8q distinct from MYC in bronchial carcinoma in situ lesions. *Lung Cancer* 2004 Jun;44(3):403-4.
- (245) Raikhlin NT, Bukaeva IA, Smirnova EA, Gurevich LE, Delektorskaia VV, Polotskii BE, et al. Significance of the expression of nucleolar argyrophilic proteins and antigen Ki-67 in the evaluation of cell proliferative activity and in the prediction of minimal (T1) lung cancer. *Arkh Patol* 2008 May;70(3):15-8.
- (246) Wardwell NR, Massion PP. Novel strategies for the early detection and prevention of lung cancer. *Semin Oncol* 2005 Jun;32(3):259-68.
- (247) Salaun M, Sesboue R, Moreno-Swirc S, Metayer J, Bota S, Bourguignon J, et al. Molecular predictive factors for progression of high-grade preinvasive bronchial lesions. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Apr 15;177(8):880-6.
- (248) Okudela K. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 2009 Aug;175(2):867-81.