

# Patología molecular

## Patología molecular de las lesiones preneoplásicas

J. Sanz Ortega

*Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

### INTRODUCCIÓN

El principal reto en oncología es el diagnóstico precoz. Para ello es preciso establecer el riesgo que determinadas células tienen de sufrir transformación maligna. Actualmente la detección de poblaciones celulares con un riesgo alto de transformación maligna depende en gran manera de la determinación de alteraciones histológicas catalogadas con mayor o menor acierto como lesiones preneoplásicas. Sin embargo, es posible que próximamente nuevos datos moleculares puedan añadirse a los histológicos y podamos hacer una mejor caracterización de subgrupos biológicos de riesgo.

Por tanto es preciso tener presentes los conocimientos actuales sobre la transformación maligna o proceso carcinogénico. Las neoplasias hematógenas como los linfomas y las leucemias, así como algunos tumores de partes blandas, son el resultado de un número reducido de alteraciones genéticas, habitualmente translocaciones, que son suficientes para provocar la transformación maligna. Sin embargo, la mayoría de las neoplasias no hematógenas requieren la acumulación de numerosas alteraciones genéticas en las que se van a activar oncogenes e inactivar genes supresores de tumores o genes que regulan la apoptosis. En condiciones fisiológicas estos numerosos genes alterados codificaban proteínas que en su mayoría regulaban funciones cruciales de la célula

como el ciclo celular, en ocasiones complementarias y que podrían compensarse parcialmente a medida que se van alterando los diferentes genes. Probablemente la transformación maligna representa un proceso irreversible en que la acumulación de alteraciones ha superado los mecanismos compensadores y correctores de la célula (1). Mientras se van acumulando las alteraciones somáticas genéticas que constituyen la carcinogénesis las células podrían o bien no presentar alteraciones histológicas o bien presentar cambios morfológicos o fenotípicos reconocidos como lesiones preneoplásicas en el estudio anatomopatológico. Como veremos en esta revisión, se han detectado alteraciones somáticas genéticas en diferentes lesiones preneoplásicas e incluso en células histológicamente normales. La caracterización de estas alteraciones en dichas células podría permitir definir subgrupos biológicos en lesiones histológicamente similares con diferente potencial de transformación maligna.

### ALTERACIONES SOMÁTICAS GENÉTICAS EN LESIONES PRENEOPLÁSICAS

Diferentes tipos de mutaciones pueden alterar genes: mutaciones puntuales, deleciones, amplificaciones, inserciones, translocaciones o inversiones. Dos familias prin-

principales de genes desempeñan un papel fundamental en la carcinogénesis: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes más frecuentemente alterados en el cáncer son *K-ras* y *c-myc*. Los genes supresores de tumores más importantes parecen ser *p53*, *Rb*, *p16* y *APC/MCC*. Una mutación puntual en un alelo puede ser suficiente para codificar una oncoproteína mutada y activar un oncogén, mientras que la inactivación de los genes supresores de tumores requiere la alteración de ambos alelos. Determinados genes supresores de tumores, como *p53*, se inactivan frecuentemente por la teoría de Knudson, que exige la delección de uno de los dos alelos, materno o paterno, y la inactivación del restante mediante mutación puntual (2). Otros, como *p16*, se inactivan frecuentemente por deleciones homocigotas (3). La detección de la delección alélica constituye un método indirecto pero rápido y eficaz de sugerir la presencia de un gen supresor importante en la evolución de una determinada neoplasia, ya que la detección de mutaciones puntuales es técnicamente más complicada y puede requerir el estudio de diferentes exones del gen. Desde esta perspectiva vamos a revisar las principales alteraciones genéticas descritas en lesiones preneoplásicas.

En primer lugar analizamos la incidencia de mutaciones puntuales en lesiones preneoplásicas. Las mutaciones puntuales más frecuentemente descritas en neoplasias humanas afectan al oncogén *K-ras* y al gen supresor *p53*. Se han descrito mutaciones de *K-ras* en diferentes lesiones preneoplásicas, siendo en los adenomas de colon, en la colitis ulcerosa y en las displasias de vejiga donde parecen tener mayor incidencia (4-6). Sin embargo existen amplias divergencias entre diferentes estudios, probablemente debidas a diferencias metodológicas, y su papel como factor predictivo de la transformación maligna no ha podido establecerse de manera convincente. También se han descrito mutaciones de *K-ras* de manera ocasional en el esófago de Barrett, la displasia gástrica, las neoplasias intraepiteliales de cérvix y la hiperplasia endometrial atípica (7-10). Se han observado mutaciones del gen supresor de tumores *p53* en la metaplasia de Barrett, el esófago de Barrett con displasia y adenomas de colon, con una incidencia que en algunos estudios con series pequeñas alcanza el 60% (11-13). También ocasionalmente se han descrito en diferentes lesiones preneoplásicas gástricas, de cabeza y cuello, pulmón, mama e incluso en la mucosa peritumoral de un hipernefoma (14-17). Mutaciones de otros oncogenes, como *c-myc*, y

otros genes supresores de tumores, como *p16* o *APC/MCC*, son excepcionales, aunque mutaciones de estos dos últimos genes supresores se han descrito en esófagos de Barrett y adenomas de colon, respectivamente, como analizamos más adelante (18, 19).

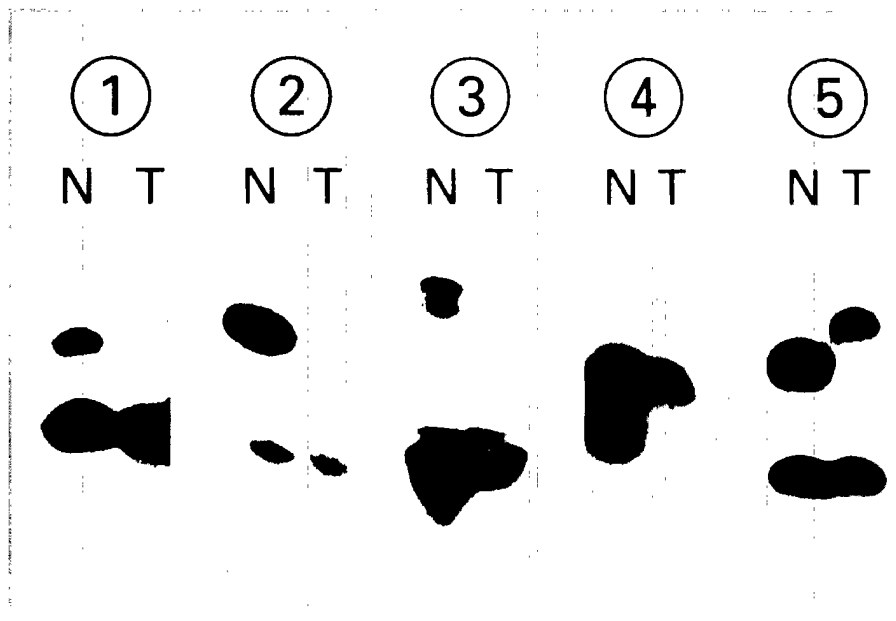
Por lo tanto, la detección de mutaciones puntuales en lesiones preneoplásicas tiene una incidencia muy baja en la mayoría de los estudios efectuados hasta el momento (con la excepción de tasas de incidencia elevadas en algunas cortas series de lesiones preneoplásicas de colon, vejiga y esófago), presenta grandes dificultades metodológicas y tiene escasa significación pronóstica.

Las amplificaciones de diferentes genes, generalmente relacionadas con factores de crecimiento o reguladores del ciclo celular como la ciclina D1, son realmente excepcionales, aunque posiblemente dificultades técnicas para su detección en lesiones preneoplásicas contribuyan a ello (20).

Dentro de las diferentes alteraciones genéticas que intervienen en el desarrollo y la progresión neoplásica, las deleciones alélicas en diferentes regiones cromosómicas podrían tener gran importancia pronóstica por su frecuencia y facilidad de detección (Fig. 1). De hecho se han descrito en un gran número de lesiones preneoplásicas, lo que permite sugerir que son un acontecimiento genético temprano en el proceso de alteración de los diferentes genes, fundamentalmente de los genes supresores de tumores. Algunas deleciones de *locus* determinados serían frecuentes en la carcinogénesis de neoplasias de diversas localizaciones y otras más específicas de determinados tipos de tumores. Esta elevada frecuencia de deleciones obliga a centrar esta revisión en algunos grupos de neoplasias y sus lesiones precursoras. Analizamos con mayor detenimiento la carcinogénesis de mama, esófago/estómago y pulmón, analizando los problemas técnicos específicos del estudio de lesiones preneoplásicas, revisando la literatura y resumiendo los resultados obtenidos por nosotros mismos y otros grupos con que hemos colaborado y que participan en esta misma línea de investigación.

### **Problemas técnicos del análisis molecular de las lesiones preneoplásicas**

Es muy importante separar grupos de células que podrían tener diferentes alteraciones moleculares dentro



**Figura 1.** LOH detectado con técnicas radiactivas. Los casos 1-4 muestran delección de una de las dos bandas (alelos) presentes en las células normales (columna N), que está ausente en las células del tumor (columna T). El caso 5 muestra inestabilidad: un alelo varía en el tumor con respecto a las células normales.

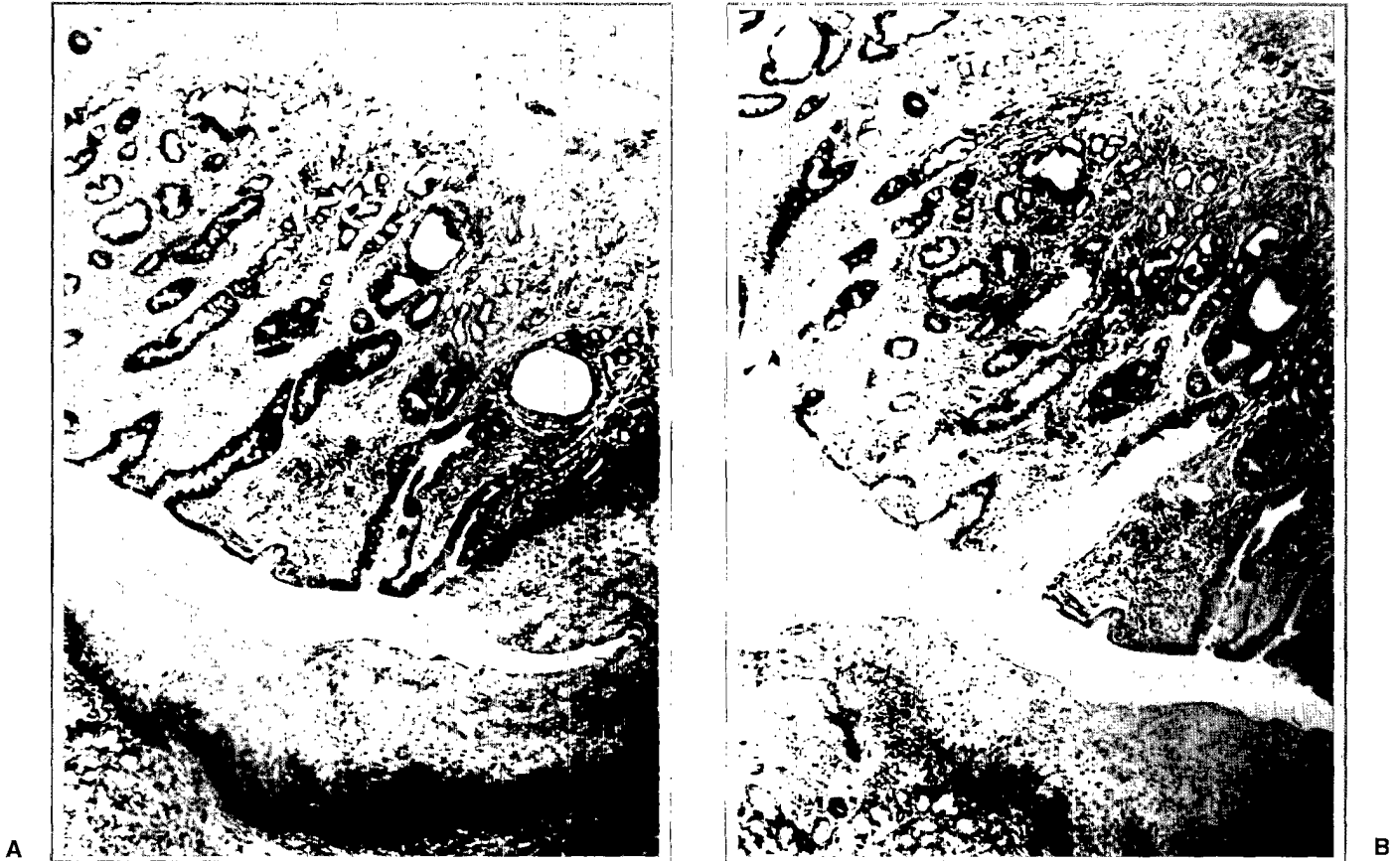
incluso del mismo corte histológico. Así por ejemplo, en una misma lesión podemos encontrar células normales, inflamatorias o epiteliales, células con metaplasia sin displasia, células con displasia y células neoplásicas infiltrantes. La técnica de microdissección que separa y obtiene células de cada uno de estos grupos es crucial para saber a qué células corresponde el DNA que estamos analizando y para compararlas unas con otras (Fig. 2). Diferencias en la técnica de microdissección pueden ser parte del motivo por el cual diferentes grupos investigadores obtienen resultados dispares (21).

Otro problema derivado del anterior es que si realmente queremos ser selectivos en las células que analizamos, en muchos casos la cantidad de células y DNA obtenidos es muy reducida. Ello obliga a que la mayoría de los estudios se realicen con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para un máximo aprovechamiento es conveniente optimizar al máximo las condiciones y si es posible desarrollar técnicas de PCR múltiple que permitan analizar varias regiones cromosómicas en la misma reacción. Por este mismo motivo el estudio de delecciones es más fácil de llevar a cabo que el de mutaciones puntuales en diferentes exones de un gen o el estudio de amplificaciones que requieren una importante cantidad de DNA para realizar una técnica de *Southern-*

*blot*. Posiblemente otros métodos en desarrollo, como la PCR en tiempo real, puedan permitir en el futuro obviar la realización de esta última técnica.

### Mama

En las lesiones de mama se han realizado grandes esfuerzos tratando de determinar las alteraciones somáticas genéticas que pudieran diferenciar subgrupos de riesgo, representando por ello un excelente ejemplo de los conocimientos actuales y perspectivas futuras de aplicación de estos estudios moleculares. Existen dos modelos carcinogénicos bien definidos: el primero evolucionaría desde la hiperplasia ductal atípica a carcinoma ductal *in situ* y a carcinoma ductal infiltrante, y el segundo desde la hiperplasia lobulillar atípica al carcinoma lobulillar *in situ* y carcinoma lobulillar infiltrante. En éstas y otras lesiones benignas de mama se ha observado que las mutaciones de *K-ras* son muy infrecuentes, al igual que las de *p53*. Como ejemplo, Millikan y cols. (22) solamente encontraron cinco casos de mutación de *p53* entre los 6805 analizados. Un dato interesante aportado por la patología molecular es que tanto las hiperplasias ductales atípicas como el papiloma intraductal parecen ser lesiones mono-



**Figura 2.** Microdissección de diferentes grupos de células dentro del mismo corte histológico. Se representa cómo se obtienen diferentes grupos de células neoplásicas, en este caso de un esófago de Barrett. A) El corte antes de la microdissección. B) La misma región de la imagen A tras haberse disecado dos glándulas: una más profunda, superior, y otra más alargada que llega hasta la superficie.

clonales (23). Los estudios de pérdida de heterocigosidad son los únicos que encuentran alteraciones genéticas en un porcentaje importante de casos, siendo las regiones cromosómicas más frecuentemente delecionadas 3p, 11q y 17p (24, 25). En diversos trabajos coordinados por Merino y cols. (26, 27) se encontraron frecuentes deleciones en 11q13 que afectaban al 67% de los carcinomas ductales infiltrantes, 71% carcinomas ductales *in situ*, 50% de los carcinomas lobulillares infiltrantes y menor al 10% en hiperplasias ductales atípicas, carcinomas lobulillares *in situ* e hiperplasias lobulillares atípicas. Dentro de cada uno de estos grupos, las deleciones permitían establecer subgrupos biológicos de peor pronóstico, ya que eran más frecuentes en carcinomas ductales de bajo grado histológico que en los de alto grado y en las zonas de hiperplasia lobulillar atípicas próximas a áreas de carcinoma que en las hiperplasias aisladas (26-28).

A pesar de estos datos puntuales, estas determinaciones todavía están lejos de permitir una importante aportación al pronóstico del potencial maligno de las lesiones preneoplásicas de la mama.

### Estómago y esófago

En estas localizaciones se pueden establecer dos modelos carcinogénicos: uno que abarcaría desde el esófago de Barrett con y sin displasia hasta el adenocarcinoma de esófago, y otro desde la metaplasia intestinal y la displasia hasta el adenocarcinoma gástrico.

Las mutaciones puntuales del oncogén *K-ras* también son infrecuentes en estas lesiones. En un amplio estudio de Trautman y cols. (29) se encontraron mutaciones en 1/252 esófagos de Barrett sin displasia y en 4/105 casos con displasia. Como hemos mencionado anterior-

mente, sólo las mutaciones de *p53* en algunas cortas series parecen ser frecuentes. Casson y cols. (13) encuentran mutaciones en 6/10 esófagos de Barrett sin displasia grave. *p16* es un gen supresor de tumores que parece desempeñar un papel importante en la carcinogénesis del esófago, con un 23% de mutaciones en adenocarcinomas según un estudio de Barrett y cols. (19). Otro importante gen supresor en neoplasias digestivas es el gen de la Poliposis Adenomatosa de Colon (*APC/MCC*), habiéndose detectado mutaciones puntuales en uno de los dos alelos del gen en adenomas de colon y adenomas planos gástricos (32, 33).

Las deleciones son, de nuevo, la alteración genética más frecuente en lesiones preneoplásicas. Las deleciones alélicas de la región cromosómica donde asienta el gen *APC/MCC* son relativamente frecuentes en las lesiones de colon, estómago y esófago de Barrett, al igual que las deleciones en 9p, 11q, 17p y 18q (30-33). Concretamente, las deleciones en 9p21, el *locus* del gen supresor *p16*, se han descrito en un 75% de los adenocarcinomas de esófago, afectando en el 100% de dichos casos a la mucosa de Barrett adyacente (19).

Nosotros hemos detectado deleciones en 5q21, el *locus* del gen *APC/MCC*, un 25% en metaplasias intestinales gástricas, un 33% en displasias gástricas leves-moderadas y un 84% en adenocarcinomas gástricos. En el esófago se determinaron deleciones en un 50% de adenocarcinomas pero, de nuevo, estaban presentes en el 100% de los casos en la mucosa de Barrett adyacente (34, 35).

Estos datos permiten sugerir que la determinación de las deleciones en 5q21, 9p21 y 17p podrían servir para definir subgrupos biológicos de esófagos de Barrett con diferente riesgo de transformación maligna.

## Pulmón

En el cáncer de pulmón, aunque los modelos carcinogénicos están peor definidos, es posible buscar alteraciones somáticas genéticas en una mucosa morfológicamente normal, lesiones metaplásicas y displásicas. Además estas determinaciones pueden hacerse en citologías, esputos, lavados y cepillados.

De nuevo, revisando la literatura encontramos que las mutaciones puntuales de *K-ras* y *p53* son infrecuentes en lesiones preneoplásicas (36, 37). Sin embargo, se ha de-

mostrado su presencia en citologías. En un estudio desarrollado en el Hospital Johns Hopkins algunos autores encontraron mutaciones de *p53* en esputos de pacientes que luego desarrollaron carcinomas pulmonares, pero la incidencia fue muy baja: sólo ocho casos de todas las muestras de esputo recibidas durante un periodo de ocho años (38). Los estudios de pérdidas alélicas son nuevamente los que encuentran unas tasas de incidencia más elevadas en lesiones preneoplásicas. Las regiones cromosómicas más frecuentemente implicadas son 3p (cromosoma que parece ser muy importante en la carcinogénesis pulmonar), 5q, 9p, 13q y 17p (39, 40). De estos estudios destaca el de Thiberville y cols. (41), que analiza de manera combinada diferentes regiones cromosómicas. Los autores encontraron deleciones frecuentes en 3p, 5q y 9p, que analizadas de manera independiente no tenían una importancia pronóstica muy relevante pero que cuando coincidían en un mismo paciente sí permitían caracterizar de manera más contundente un elevado riesgo de transformación maligna.

Nosotros hemos encontrado hasta un 33% de casos de mucosa bronquial histológicamente normal adyacente a células neoplásicas que presentaban pérdidas alélicas en 3p y 5q (datos aún no publicados).

## CONCLUSIONES

Hemos revisado cómo pueden encontrarse alteraciones somáticas genéticas en lesiones preneoplásicas. Estas alteraciones incluyen principalmente mutaciones ocasionales del oncogén *K-ras*, así como mutaciones y deleciones relativamente frecuentes en diversas regiones cromosómicas relacionadas con genes supresores de tumores. La importancia de estos hallazgos nos obliga a efectuar esfuerzos que permitan avanzar en el diagnóstico precoz del cáncer. Para ello el siguiente paso es dirigir nuestras investigaciones a tratar de demostrar subgrupos con diferente riesgo de malignización en grupos homogéneos de lesiones consideradas preneoplásicas o en biopsias y citologías histológicamente normales, que podrían llegar a nuestras manos y permitirnos explorar el proceso carcinogénico que dichas células han recorrido.

Dos hechos suponen en principio el mayor obstáculo para avanzar hacia esa meta aparentemente utópica de establecer el riesgo biológico de transformación maligna. En primer lugar, la complejidad del proceso carcino-

genético: no hay una única secuencia de alteraciones genéticas que desencadena el cáncer sino un complejo entramado de interacciones de diversos genes, lo que, en nuestra opinión, condena al fracaso a aquellos proyectos para determinar factores pronóstico en los que no se analicen simultáneamente varios de estos genes. En segundo lugar, la cantidad de DNA que debemos obtener mediante la técnica de microdissección debe ser limitada para ser rigurosos en la selección de las células a analizar. En este aspecto la función del patólogo es fundamental.

Para tratar de obviar los inconvenientes anteriormente mencionados, debemos centrar nuestros esfuerzos en la determinación de las alteraciones genotípicas frecuentes y relativamente sencillas de analizar. Las deleciones alélicas parecen ser las alteraciones somáticas genéticas más frecuentes en lesiones preneoplásicas. Probablemente, el estudio de mutaciones puntuales en oncogenes y genes supresores de tumores tenga en general tasas de incidencia demasiado bajas para poder establecer una importancia pronóstica. Por otro lado, el estudio de deleciones permite obtener un máximo rendimiento de la escasa cantidad de DNA obtenida en las lesiones preneoplásicas y analizar varias regiones cromosómicas simultáneamente. Si aceptamos la carcinogénesis como un proceso de varios pasos donde es más importante la acumulación de alteraciones genéticas que el orden en que ocurren, debemos proseguir las investigaciones en la dirección de crear paneles que permitan detectar la acumulación de alteraciones en varios genes clave en el mismo grupo de células.

En función de los datos previamente expuestos podemos sugerir dos paneles que, aparentemente, podrían identificar subgrupos biológicos de células con un alto riesgo de transformación maligna: la determinación de deleciones en 5q21, 9p21 y 17p en esófagos de Barrett, y la determinación de deleciones en 3p, 5q y 9p en lesiones preneoplásicas pulmonares.

Es posible que en el futuro la interacción del patólogo con las células le exija no sólo detectar alteraciones histológicas fenotípicas sino aplicar éstos u otros paneles para determinar alteraciones somáticas genéticas en grupos de células seleccionados cuidadosamente con técnicas de microdissección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Farber E. *The multistep nature of cancer development*. Cancer Res 1984; 44: 4217-4223.
- Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF y cols. *Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in SCLC*. Cancer Res 1990; 50: 3067-3072.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y y cols. *Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours*. Nat Genet 1995; 11(2): 210-212.
- Saraga E, Bautista A, Dorta G y cols. *Genetic heterogeneity in sporadic colo-rectal adenomas*. J Pathol 1997; 181: 281-286.
- Shapiro BD, Lastner BA. *Cancer biology in ulcerative colitis and potential use in endoscopic surveillance*. Gastrointest Endosc Clin N 1997; 7: 453-466.
- Djiki T, Fujimori T. *K-ras gene mutation in gall bladder carcinomas and dysplasias*. Gut 1996; 38: 426-429.
- Trautmann B, Wittekind C. *K-ras point mutation are rare events in premalignant forms of Barrett esophagus*. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8: 799-804.
- Sakurai S, Sano T, Maeshima A y cols. *Gastric adenoma-carcinoma sequence with special reference to p53 and K-ras gen alterations*. Virchows Arch 1995; 427: 119-124.
- Von Le L, Steerker L, Rinehart CA, Fowler WC. *H ras mutation in cervical dysplasia*. Gynecol Oncol 1993; 49: 181-184.
- Sasaki H, Nishii H. *Mutations of K-ras in human endometrial hyperplasia and carcinoma*. Cancer Res 1993; 53: 1906-1910.
- Camparzenasi P, Conio M, Bogliolo M y cols. *A p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5: 559-565.
- Fearon ER, Vogelstein BA. *A genetic model of colorectal carcinogenesis*. Cell 1990; 61: 759-767.
- Casson A, Mukhopadhyay T, Malley F y cols. *Clinical implications of p53 gene mutation in the progression of Barrett epithelium to invasive cancer*. Am J Surg 1994; 167: 52-57.
- Nakatsuru S, Yanagisawa A, Hota A y cols. *Somatic mutations of the APC gene in precancerous lesion of the stomach*. Human Mol Genetics 1993; 2: 1463-1465.
- Gallo O, Franchi A, Chiarelli T y cols. *A potential biomarker in predicting progression of epithelial hyperplastic lesions of the larynx*. Acta Otolaryngol 1997; 527: 30-38.
- Lau R, el Dabsagh L, Mourad WA. *A mutant p53 expression in kidney tubules adjacent to renal cell carcinoma*. Mod Pathol 1996; 9: 690-695.
- Matsuda H, Konishin N, Hiasa Y y cols. *Alterations of the p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions*. J Oral Pathol Med 1996; 25: 232-238.
- Osagawara S, Maesawa C, Tamura G, Satodate R. *A lack of mutations of the APC gene in esophageal and gastric carcinomas*. Virchow Archiv 1994; 424: 607-611.
- Barrett MT, Sánchez CA, Galipeau PC y cols. *Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus*. Oncogene 1996; 13: 1867-1873.
- Kim JS, Choi CW. *Amplification of c-ErbB2 in cancer foci, adjacent normal, metaplasia and primary gastric adenocarcinoma*. J Korean Med Sci 1997; 12: 311-315.
- Ronai Z, Minamoto T, Butler T y cols. *Sampling method as a key factor in identifying K-ras oncogene mutations in preneoplastic colorectal lesions*. Cancer Detect Prev 1995; 19: 512-517.
- Millikan R, Hulka B, Thor A y cols. *p53 mutations in benign breast tissue*. J Clin Oncol 1995; 13: 2293-2300.

23. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. *A clonal analysis of predominantly intraductal carcinoma and precancerous lesions of the breast.* Cancer Res 1994; 54(7): 1894-1953.
24. Ahmadian M, Witsuda I, Fong KM y cols. *Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer and preneoplastic lesions.* Cancer Res 1997; 57: 3664-3668.
25. Madeiros AC, Nagai MA, Neto MM, Brentani RR. *LOH affecting the APC and MCC loci in patients with primary breast carcinomas.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 331-333.
26. Nayar R, Zhuang Z, Merino MJ, Silverberg SG. *LOH on 11q13 in lobular lesions of the breast.* Hum Pathol 1997; 28: 277-282.
27. Chuaqui RF, Zhuang Z, Emmert-Buck MR y cols. *Analysis of LOH on chromosome 11q13 in atypical ductal hiperplasia and in situ carcinoma of the breast.* Am J Pathol 1997; 150: 297-303.
28. Sanz-Ortega J, Chuaqui RF, Zhuang Z y cols. *LOH at 5q21 in male breast cancer.* J Natl Cancer Inst 1996; 87: 1408-1409.
29. Trautman B, Wittekind C, Strobel D y cols. *K-ras point mutations are rare events in premalignant forms of Barrett's oesophagus.* Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8(8): 799-804.
30. Barrett MT, Galipeau PC, Sánchez CA y cols. *Determination of the frequency of LOH in esophageal adenocarcinoma.* Oncogene 1996; 12: 1873-1878.
31. Tamura G, Maesawa C, Osagawara S y cols. *Primary gastric carcinoma cells frequently lose heterozygosity at the APC loci.* Jpn J Cancer Res 1993; 84: 1015-1018.
32. González MV, Artímez ML, Rodrigo Ly cols. *Mutation analysis of the p53, APC and p16 genes in Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma.* J Clin Pathol 1997; 50: 212-217.
33. Maesawa C, Tamura G, Osagawara S y cols. *Aberrations of tumor-suppressor genes (p53, APC, MCC and Rb) in esophageal carcinoma.* Int J Cancer 1994; 57: 21-25.
34. Sanz-Ortega J, Sanz-Esponera J, Sobel M, Merino MJ. *LOH at the APC/MCC in gastric cancer and preneoplastic lesions.* Path Res Pract 1996; 192: 1206-1210.
35. Zhuang Z, Vortmeyer A, Merino MJ y cols. *Barrett's esophagus: Metaplastic cells with LOH at the APC gene locus are clonal precursors to invasive adenocarcinoma.* Cancer Res 1996; 56: 1961-1964.
36. Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, Gazdar AF. *K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas.* Cancer Res 1994; 54: 5811-5815.
37. Gazdar AF, Sugio K. *The molecular and cellular basis of human lung cancer.* Anticancer Res 1994; 14: 261-267.
38. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. *Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer.* Cancer Res 1994; 54: 1634-1637.
39. Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY y cols. *LOH in chromosome 9p in preneoplastic lesions accompanying NSCLC.* J Natl Cancer Inst 1996; 87: 1224-1229.
40. Field JK, Neville EM, Stewart MP y cols. *Fractional allele loss data indicate distinct genetic populations in the development of NSCLC.* Br J Cancer 1996; 74: 1968-1974.
41. Thiberville L, Payne P, Vielkinds J y cols. *Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus.* Cancer Res 1995; 55: 5133-5139.

