

Patología molecular

Patología molecular de las neoplasias de pulmón

G. Toledo

Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria, Pamplona.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de pulmón es la causa más frecuente de mortalidad por cáncer según las estadísticas más recientes en EE.UU. (1). Está ampliamente aceptado que el tabaco es la mayor causa de esta neoplasia. Desde el punto de vista pronóstico y terapéutico el carcinoma de pulmón puede seguir clasificándose en los dos grandes grupos clásicos de carcinoma microcítico o de células pequeñas (CMP) y no microcítico (CNMP), englobando éste a su vez a las formas más frecuentes de carcinoma escamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

Como en otras neoplasias epiteliales, se piensa que el cáncer de pulmón surge después de una serie de cambios histopatológicos progresivos –denominados lesiones preinvasoras o preneoplásicas– en el epitelio bronquial. Hasta la nueva clasificación de la OMS (1999), sólo estaba establecida la secuencia de cambios histológicos para el carcinoma escamoso. Estos pasos preneoplásicos incluyen la hiperplasia, la metaplasia escamosa, la displasia y el carcinoma *in situ* (CIS). Los carcinomas de pulmón con frecuencia son extensos y multifocales a lo largo de todo el árbol respiratorio, como consecuencia

de un fenómeno al que generalmente se denomina “cancerización de campo”. En la última clasificación de la OMS se incluyen además como lesiones preneoplásicas la hiperplasia adenomatosa alveolar para el adenocarcinoma, y la hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas pulmonares para tumores neuroendocrinos. Aunque no está claro aún si el carcinoma microcítico y el no microcítico derivan de la misma célula madre o de diferentes, los estudios sobre la etiología molecular del carcinoma de pulmón han aportado muchos avances, sobre todo en relación con los oncogenes y genes supresores tumorales.

La importancia del estudio de la patología molecular en las neoplasias de pulmón radica en el papel potencial de los resultados posibles, para sugerir marcadores genéticos para la detección precoz y poder encauzar la posible quimioprevención, así como para indicar nuevos puntos clave para el desarrollo de fármacos, vacunas y/o posibles vías de terapia génica (2). Existe un gran número de estudios que han identificado alteraciones genéticas en el carcinoma de pulmón. Aunque en menor número, en los últimos años se han empezado a investigar

anomalías en lesiones preneoplásicas y en el epitelio bronquial normal en sujetos fumadores y no fumadores. Algunas de estas alteraciones ya descritas se encuentran tanto en el carcinoma no microcítico como en el microcítico, mientras otras lo hacen preferentemente en uno de estos subtipos. La relación de alteraciones estudiadas es tan numerosa que es difícil intentar recopilarlas todas de un modo amplio, sin embargo intentaremos hacer una revisión de las más relevantes, de forma relativamente ordenada (Tabla 1).

ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS Y SUS IMPLICACIONES

Se han identificado varias alteraciones cromosómicas aleatorias tanto en líneas celulares de carcinoma de pulmón como en tejido fresco de diferentes neoplasias que afectan fundamentalmente a los cromosomas **3p**, **9p** y **17p** (4).

Cromosoma 3p

Dentro del cromosoma **3p** se han visto afectadas tres regiones distintas: **3p25**, **3p21.3** y **3p14**. Esta última, denominada también **FRA3B**, se considera un punto de fragilidad genómica, donde se describen frecuentes deleciones y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en numerosos tumores. Las pérdidas alélicas o deleciones en este cromosoma se detectan en casi un 90% de los CMP,

y entre un 50% a 80% de CNMP (3, 5). Estos hallazgos sustentan una fuerte evidencia respecto al postulado de que varios genes supresores tumorales estén localizados en el **3p** y sus alteraciones sean puntos clave en la oncogénesis del carcinoma pulmonar.

Las deleciones son indicadores de la localización de genes supresores. En varias líneas celulares de carcinoma de pulmón se han encontrado cinco regiones delecionadas: tres en **3p21**, una en **3p12-13** y otra en **3p14.2**. A pesar de haber estudiado de modo extensivo la región **3p21.3** en busca de posibles genes supresores tumorales, no se han identificado todavía. Únicamente en esta región se observa la presencia de los genes correspondientes a las **semaforinas**, observándose algunas anomalías cromosómicas en la sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón y en controles expuestos a los benzopirenos, carcinógenos del humo del tabaco. En la región **3p25** se encuentra el gen supresor tumoral de la enfermedad de Von Hippel-Lindau (**VHL**), frecuentemente mutado en carcinomas de células renales pero que se ha observado raramente en el carcinoma de pulmón.

Se consideran también candidatos posibles en **3p** el protooncogén **c-RAF-1**, el gen del receptor del ácido retinoico y el gen de la fosfatasa- γ de la tirosina (**PTP- γ**), entre otros. Más recientemente se ha localizado el gen **FHIT** (Fragile Histidine Triad), en **3p14.2** dentro de **FRA3B**, observándose alteraciones del mismo en más del 80% de CMP. Este gen comprende diez exones que codifican la proteína **Fhit**, una hidrolasa dinucleósido

Tabla 1. Alteraciones genéticas en el carcinoma de pulmón (3).

	Carcinoma microcítico	Carcinoma no microcítico
Incidencia	25%	75%
Mutación RAS	<1%	15%-20%
Amplificación gen MYC	15%-30%	5%-10%
Expresión BCL-2	75%-95%	10%-35%
Mutaciones p53	75%-100%	50%
Expresión alterada p53 (IHQ)	40%-70%	40%-60%
Ausencia expresión pr. RB	90%	15%-30%
Mutaciones p16	<1%	10%-40%
Ausencia expresión p16 (IHQ)	0%-10%	30%-70%
Actividad telomerasa	100%	80%-85%
Fenotipo neuroendocrino	100%	Tumor NECG y carcinoideas
Sensibilidad a la radiación	Alta	Baja
Sensibilidad a quimioterapia	Alta	Baja

IHQ: inmunohistoquímica; NECG: neuroendocrino de célula grande.

pérdidas en el cromosoma **8p** (21.3-22) en el 50% de los casos, así como en **9p** (21-22) donde se localizan los genes supresores del p15 y **p16** (MTS2/p15^{INK4B} y mts1/p16ink4a) en el 65% de estos tumores. En un 20% a 46% se detectan alteraciones en la región p13, en el gen **11p**, dando lugar a deleciones en el gen supresor tumoral del tumor de Wilms.

En los CMP las alteraciones del **9p** son infrecuentes, mientras que las descritas en **3p**, **5q21** (gen *APC*), **13q** y **17p** se ven más a menudo que en CNMP (3).

Telomerasa

Los **telómeros** son elementos genéticos dispuestos en los extremos de los cromosomas, constituidos por repeticiones en tándem de secuencias de DNA. Son elementos esenciales para proteger al cromosoma de la degradación, las recombinaciones inadecuadas y el envejecimiento. Son fragmentos amplios en las células germinales y las células tumorales. Con las sucesivas divisiones celulares sufren un acortamiento progresivo, debido a las pérdidas de secuencias terminales de DNA en el proceso de la replicación. La **telomerasa** es una ribonucleoproteína especializada, de acción polimerasa, que añade repeticiones TTAGGG a los telómeros para compensar el acortamiento, asociándose a la adquisición de un fenotipo inmortal. Varios estudios han demostrado una ausencia de expresión de actividad telomerasa en células somáticas normales, mientras que líneas celulares inmortalizadas, células germinales y algunos tumores muestran una alta expresión de la misma. Estos datos sugieren que la activación de la telomerasa puede ser un paso crítico en la oncogénesis e inmortalidad de las células. Esta activación puede ser detectada por la actividad enzimática mediante amplificación de las repeticiones teloméricas por PCR a partir de tejido fresco o congelado, o bien por la detección de la expresión del producto de RNA, mediante hibridación *in situ* en los tejidos. Se ha demostrado su actividad en el 80% de todos los tumores de pulmón, con un 70% en CNMP y de casi el 100% en CMP, en la detección por PCR de la amplificación de las repeticiones teloméricas (9).

Estas observaciones muestran una buena correlación entre la actividad de la telomerasa y el potencial maligno de los CMP en relación con el porcentaje de células que parecen hacerse "inmortales" en este tipo de tumores (10, 11).

Alteraciones en la longitud de los telómeros

La alteración en la longitud de los telómeros como representación del número de las divisiones celulares se asocia frecuentemente con una alta actividad telomerasa, así como con las pérdidas alélicas en los genes supresores p53 y Rb que desempeñan un papel en la progresión tumoral de los carcinomas de pulmón. Estas alteraciones se han observado tanto en estadios precoces de adenocarcinomas como en estadios más avanzados de otros tipos histológicos y lesiones preneoplásicas (12). El 85% de los tumores de pulmón con una baja o indetectable actividad de telomerasa tiene longitudes de telómeros similares al tejido normal pulmonar adyacente. En CMP y lesiones metastásicas la mayor longitud de los telómeros está correlacionada con un peor pronóstico (9).

La telomerasa en tumores neuroendocrinos

Los tumores neuroendocrinos de pulmón representan un espectro amplio de tipos clinicopatológicos que van desde los carcinoides de bajo grado (típicos) al carcinoma de células pequeñas altamente maligno. Se reconocen dos formas intermedias: el carcinóide atípico y el carcinoma neuroendocrino de células grandes. La expresión del RNA de la telomerasa ha sido determinada en estos tipos de tumores neuroendocrinos pulmonares por hibridación *in situ*. La expresión se correlaciona con el grado histológico del tumor, observándose concentraciones muy bajas de telomerasa en los carcinoides típicos de bajo potencial maligno, mientras que el resto de las formas de alto potencial maligno, sobre todo el carcinoma neuroendocrino de células grandes ampliamente metastásico y el carcinoma de células pequeñas, muestran una muy alta expresión de la misma en el 100% de estos tumores (11, 13).

Telomerasa en lesiones preneoplásicas

Se ha detectado la telomerasa en lesiones preinvasoras en carcinoma de pulmón (14) con bajos grados de actividad en las lesiones de hiperplasia, displasia y carcinoma *in situ* en comparación con el carcinoma invasor de pulmón. En las células de la capa basal del epitelio bron-

quial normal e hiperplásico adyacente a zonas tumorales, se observa una débil expresión de RNA telomerasa. Esta expresión aumenta con la progresión tumoral de moderada a fuerte, a través de las distintas capas del epitelio en la metaplasia y displasia, observándose también un aumento en el carcinoma *in situ* en adyacente al invasor (14). Estos hallazgos sugieren que la telomerasa podría servir como un marcador potencial de la detección precoz del carcinoma de pulmón. Sin embargo la expresión del RNA de la telomerasa no ha sido detectada en algunas muestras estudiadas de hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) (14). Estos hallazgos sugieren dos posibilidades: que la HAA no sea un precursor o lesión preneoplásica de adenocarcinomas, o que la activación de la telomerasa sea un suceso tardío en la patogénesis de los carcinomas periféricos.

Todos estos hallazgos muestran que la mayoría de los carcinomas de pulmón invasores expresan una alta actividad telomerasa, mientras que el tejido normal tiende a ser negativo o débilmente positivo. El aumento de la expresión de telomerasa tanto en frecuencia como en intensidad, relacionado con el incremento del grado histopatológico en las preneoplasias, indica el posible papel de la telomerasa como un valioso marcador pronóstico.

Desde que se ha demostrado su papel como esencial para el crecimiento duradero de muchos tumores, la inhibición de esta enzima podría ser un blanco atractivo para nuevos tratamientos (15).

ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES

Alteraciones de oncogenes

RAS

Tiene un papel importante en la señal de transducción y en la proliferación celular. Los genes de la familia RAS fueron los primeros oncogenes descritos, estando compuestos por H-RAS (homólogo al oncogén viral del sarcoma murino Harvey), K-RAS (semejante al oncogén viral del sarcoma murino de Kirsten) y N-RAS (aislado inicialmente de una línea celular de neuroblastoma). La proteína derivada de estos genes, p21RAS, tiene un peso molecular de 21 kd y un alto parecido a la proteína G. Su actividad depende de su unión a GTP, siendo inactivada mediante la hidrólisis de GTP a GDP, por acción de una

GTPasa. Su efecto es consecuencia de una activación de proteínas tales como RAF y MAPK que reaccionan en cascada activando a su vez a factores de transcripción como MYC, FOS y JUN, que inducen la síntesis proteica. **Mutaciones puntuales** en los codones 12, 13 o 61 del gen RAS dan lugar a una transformación del dominio de la proteína, que la protege de la GTPasa, dando lugar a una activación permanente de la p21 RAS. Un 20% a 30% de adenocarcinomas, y 15% a 20% del total de CNMP, muestran estas mutaciones. De ellas el 90% son en el gen K-RAS, predominantemente en el codón 12. El 70% de las mutaciones en K-RAS son transversiones G-T (16), semejantes a las que afectan también a p53 y a las alteraciones causadas en el DNA directamente por las nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos del tabaco (17), lo que permite sugerir la relación entre el consumo de tabaco y estas alteraciones genéticas.

Las mutaciones y la **sobreexpresión** de la proteína, detectada también con técnicas inmunohistoquímicas, parecen estar correlacionadas con un peor pronóstico, de modo especial en tumores resecables (18-22). Aunque se ha sugerido que estas alteraciones en K-RAS inducen resistencia a la quimioterapia, un estudio prospectivo reciente no ha encontrado relación entre ambos en adenocarcinomas en estadios avanzados (22).

Por otro lado, las diferencias detectadas en la **expresión de p21^{RAS}** mediante *Western-blot* se correlacionan con el tipo histológico: hasta un 82% de carcinomas escamosos muestran concentraciones elevadas de proteína mientras que sólo se observan en 8% de carcinomas no escamosos. A su vez se ha descrito también cierta correlación entre los distintos subtipos y localizaciones de los adenocarcinomas, y la presencia de mutaciones en K-RAS (23).

Se ha estudiado a su vez el posible papel de las **mutaciones** en el K-RAS, en el tejido histológicamente normal, en comparación con la hiperplasia alveolar atípica (HAA) y el adenocarcinoma. Aunque se han detectado mutaciones en el codón 12 tanto en los adenocarcinomas como en las HAA, en esta última es infrecuente y no hay correlación entre ambas. Se ha sugerido que muchas HAA son lesiones independientes al observarse mutaciones en las HAA en pacientes que no tienen evidencia de adenocarcinoma y viceversa (24). Otros estudios han mostrado únicamente mutaciones en el codón 12 en las células neoplásicas sin observarla en las displasias, hiperplasias o células normales adyacentes. In-

cluso en algunos adenocarcinomas las mutaciones sólo afectan a un pequeño porcentaje de las células tumorales. Todo esto les lleva a sugerir que las mutaciones de K-RAS no son un hallazgo precoz sino que influyen de modo tardío en la carcinogénesis pulmonar.

MYC

La familia MYC –que incluye c-MYC (celular), N-MYC (aislada de líneas celulares de neuroblastoma) y L-MYC (aislada de células de CMP)– codifica una serie de proteínas que actúan como ligandos nucleares del DNA y activan la síntesis de DNA, el metabolismo de RNA y la progresión del ciclo celular. En el carcinoma de pulmón se han detectado alteraciones de los tres miembros de la familia. El mecanismo general de alteración del MYC es por **amplificación** del gen y su consecuente **sobreexpresión** proteica.

La **amplificación** de algunos de los genes MYC se observa en el 18% de CNMP y el 31% de CMP, correspondiendo al c-MYC en el 8% de CNMP y 20% de CMP. En CMP, la amplificación de c-MYC se asocia a una mayor agresividad y un peor pronóstico, y se ha observado con mayor frecuencia en pacientes con tratamiento previo y en cultivos celulares a partir de metástasis, en comparación con tumores primarios no tratados, sugiriendo que puede ser un factor patogénico tardío que contribuye a la mayor agresividad observada en las metástasis y recidivas tumorales (25). La aplicación de la técnica reciente de hibridación genómica comparativa (CGH) ha permitido detectar un aumento de las copias del DNA –reflejo de la amplificación del gen– en las regiones correspondientes a cada uno de los componentes MYC, tanto en tumores primarios como en metastásicos.

Se detecta una alteración en la **expresión** en aproximadamente un 10% de los CNMP y de modo variable entre un 10% a 40% en CMP (26). Algunos estudios demuestran una relación de este incremento con un pronóstico adverso y resistencia a la quimioterapia (27, 28).

El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) en L-MYC en CNMP parece tener un papel como marcador de capacidad metastásica, aunque con ciertas diferencias geográficas (29-32). Por otro lado, la **sobreexpresión** de la proteína L-MYC parece estar asociada a un alto grado de diferenciación neuroendocrina en CMP.

C-erbB-2

Conocido también como HER-2/neu, es un protooncogén homólogo al gen *neu* del neuroblastoma de la rata. Localizado en 17q21, codifica una proteína de 185 kd (p185^{neu}) que actúa como receptor de factores de crecimiento celulares. Su modo de acción es semejante al del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), codificado por el c-erbB-1. La **amplificación** de c-erbB-2 en carcinomas de pulmón es rara, pero está altamente sobreexpresada en aproximadamente un 25% de CNMP, especialmente adenocarcinomas, mientras que no hay estudios que demuestren su alteración en CMP. En algunos estudios parece estar asociada a periodos de supervivencia más cortos en adenocarcinomas (33-35), mientras que experimentos *in vitro* sugieren que la **sobreexpresión** se relaciona con una mayor resistencia a la quimioterapia (36).

BCL-2 Bax y apoptosis

Se ha podido demostrar que las células tumorales son capaces de salirse fuera de las vías que conducen a las células normales hacia la apoptosis, ante situaciones de daño del DNA. Junto al gen p53 y otros, el BCL-2 es un factor clave en el mecanismo de la apoptosis. Es un protooncogén que actúa como regulador negativo de la muerte celular, prolongando la supervivencia de las células e inhibiendo la apoptosis. Se han identificado numerosas proteínas de la familia de este gen. Mientras que algunas, como la proteína *bcl-2*, ejercen una función negativa sobre la muerte celular, otras son inductoras de la apoptosis, como la proteína BAX. La acción en un sentido u otro depende de la capacidad de estas proteínas de formar heterodímeros u homodímeros. En condiciones normales BCL-2/BAX forman heterodímeros. En algunas situaciones como ante un daño por radiación, la proteína p53 induce una mayor síntesis de BAX, dando lugar a la formación de homodímeros BAX-BAX que inducen apoptosis.

Los estudios en carcinoma de pulmón muestran una **expresión** aumentada de *bcl-2* mayor en CMP que en CNMP, con una frecuencia del 75% al 95% en los primeros (Fig. 2). Estos datos contrastan con la mejor respuesta a la quimioterapia de los CMP. Estudios que analizan el epitelio bronquial adyacente a los tumores detectan una expresión de *bcl-2* en las células basales, perdiéndose en

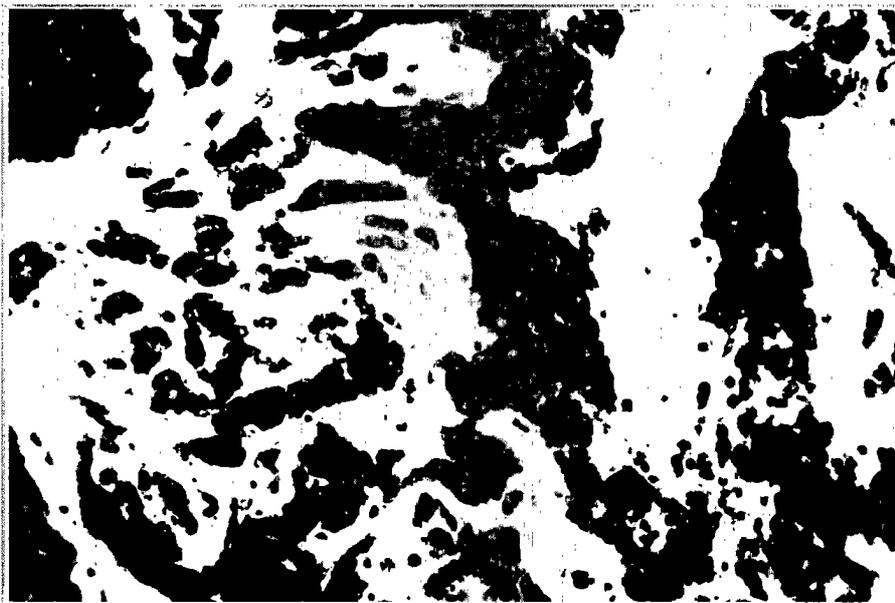


Figura 2. Carcinoma microcístico de pulmón con intensa inmunoreactividad para bcl-2 (clon 124-Dako®) (original, IHQ $\times 125$).

las células columnares más diferenciadas (37). No existe una clara relación con la supervivencia, aunque se ha planteado un posible papel del bcl-2 en la patogenia de algunos tipos de carcinomas pulmonares, favoreciendo la supervivencia a través de su efecto antiapoptótico.

Alteraciones de genes supresores tumorales

RB

El gen RB, localizado en el cromosoma 13q14.11, codifica la proteína *Rb* de 106 kd. Actúa como reguladora del ciclo celular durante la fase G0/G1. Su actividad depende de su fosforilación por las cinasas dependientes de ciclina (CDK).

Junto con el retinoblastoma, el CMP es uno de los tipos tumorales en que se describen inicialmente alteraciones de este gen. Más del 70% de estos tumores tienen una **alteración estructural** de RB o una **expresión** anormal del RNAm dando lugar a una ausencia de expresión de la proteína. La detección de alteraciones de la proteína es aún mayor, observándose en casi el 90% de los casos, como consecuencia de **hipofosforilaciones, deleciones o mutaciones** en el dominio principal de la misma.

En CNMP, las alteraciones en el RNAm se observan en el 10%, estando la **expresión** de la proteína alterada

en más del 30% de los tumores (38, 39) (Fig. 3). Ahora bien, la mayoría de los tumores que son *Rb* positivos son p16^{INK4A} (potente inhibidor de las CDK y por tanto de la fosforilación de RB) negativos. Esto podría indicar que la patogénesis de algunos tumores de pulmón depende de una alteración mutacional de la proteína *Rb* o de la ausencia de p16^{INK4A}.

p53

Gen localizado en el cromosoma 17 que codifica una proteína que actúa como factor de transcripción con una vía común al RB, bloqueando el paso de la célula en el ciclo celular a la fase G1 y disparando el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Interacciona con muchos otros factores de regulación de la transcripción, con múltiples acciones biológicas celulares. La inactivación de este gen puede de este modo contribuir a acelerar el crecimiento de las células tumorales en el cáncer de pulmón; aumentando la frecuencia de división celular y permitiendo a las células escaparse de la apoptosis. Los cambios genéticos más frecuentes en p53 asociados a tumores son las **mutaciones** (17). Sin embargo no son la única vía de inactivación de este gen. Cualquier mutación o disregulación de otros genes que se encuentren por detrás, en la misma vía del p53, interrumpiendo su función inicial puede simular y dar lugar a una mutación en p53.

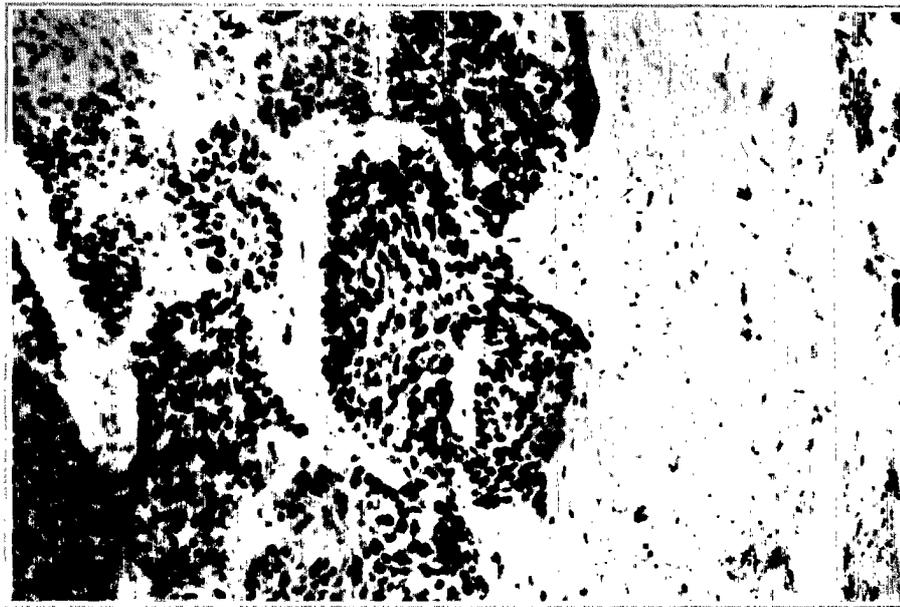


Figura 3. Carcinoma escamoso con adecuada expresión de la proteína Rb. Sólo un 30% de los carcinomas no microcíticos presentan una pérdida de la expresión de la proteína (original, IHQ $\times 125$).

Las mutaciones pueden detectarse con distintos métodos técnicos (secuenciación de DNA, RT-PCR, análisis de conformación de cadenas simples de DNA o SSCP, análisis en gel de electroforesis con gradiente de desnaturización o DGGE o inmunohistoquímica) sin que se encuentren variaciones significativas de frecuencias en el carcinoma de pulmón entre unas técnicas y otras. En las series publicadas más recientemente se detectan hasta un 50% de carcinomas de pulmón con mutaciones del p53, correspondiendo la mayoría a **transversiones** GC a TA, y que están relacionadas con el efecto cancerígeno directo del tabaco. La frecuencia de mutaciones es del 80% a 100% en CMP y de más del 50% en CNMP. La correlación de la **expresión** alterada de p53 con el pronóstico aún no está clara, aunque algunos estudios en CNMP han observado una asociación entre la sobreexpresión de p53 y la presencia de metástasis ganglionares, sin que afecte a la supervivencia en los tumores con metástasis positivas. Sin embargo, en los tumores con ganglios negativos la no ausencia de expresión de p53 sí parece ser un factor independiente, predictor de mejor pronóstico (40). Este mismo estudio encuentra una correlación de la sobreexpresión de p53, que es alta en carcinomas escamosos y de células grandes, mientras que es significativamente menos frecuente en adenocarcinomas, siendo extremadamente rara en los bronquioloalveolares (40).

En el espectro de los carcinomas neuroendocrinos de pulmón, varios estudios demuestran la ausencia de mutaciones en p53 en el carcinoide típico, con una presencia parcheada o focal (del 10% al 40%) en algunos carcinoides atípicos. Se observa una correlación entre la positividad en la expresión del p53 en estos últimos con la mayor agresividad y una supervivencia más corta significativa. Todos estos tienen mutaciones en el p53 en los exones 5-8. Sin embargo se ha observado cómo tumores neuroendocrinos de alto grado muestran mutaciones puntuales y una expresión difusa y marcada del p53. De este modo se ha planteado que la detección de la proteína p53 por inmunohistoquímica puede delimitar aquellos casos de alto riesgo para un comportamiento agresivo dentro de este grupo de tumores (13).

p16^{INK4A}

Como hemos descrito anteriormente, algunos tumores de pulmón presentan **deleciones** en el cromosoma 9p21, afectando a uno o más genes supresores. Ahí se localiza el gen p16^{INK4A}, que actúa sobre el ciclo celular inhibiendo a la CDK4 y bloqueando el paso de la célula de la fase G1 a S. En CMP apenas se han descrito alteraciones del p16. En cambio sí que son frecuentes en

CNMP en forma de deleciones o **mutaciones puntuales**, presentes en un 10% al 40% de estos tumores. Se describen también **hipermetilaciones** no asociadas a mutaciones genéticas (41).

Se ha sugerido que las mutaciones en el p16 pueden asociarse a la progresión tumoral en estudios de cultivos celulares y metástasis en comparación con tumores primarios (5). La detección inmunohistoquímica de la proteína en tumores primarios CNMP muestra que el porcentaje de negatividad aumenta en relación con el estadio clínico. Esta tendencia a perder la **expresión** de la proteína no se confirma en otros estudios pero todos coinciden en que hasta un 30% o 40% de CNMP en estadios precoces tienen una ausencia de expresión de p16. Como conclusión se postula la ausencia de expresión p16 como un factor predictor de una peor supervivencia en CNMP.

FHIT

Véase el apartado "Cromosoma 3p".

CAMBIOS MOLECULARES EN LESIONES PRENEOPLÁSICAS

En la nueva clasificación de la OMS se incluyen como lesiones preinvasoras la displasia, la metaplasia escamosa y el carcinoma *in situ* para el carcinoma escamoso, la hiperplasia adenomatosa atípica para el adenocarcinoma, y como probable precursor de tumores neuroendocrinos la hiperplasia difusa de células neuroendocrinas pulmonares. No existe, como en otros tipos de tumores, un modelo carcinogénico bien definido, aunque se han realizado numerosos estudios buscando alteraciones genéticas tanto en la mucosa normal como en lesiones metaplásicas y displásicas. Además estas determinaciones se podrían aplicar tanto en biopsias como en citologías, esputos, lavados y cepillados, con perspectivas de su utilidad para *screening* precoz.

Como ya se han comentado a lo largo de esta revisión, las mutaciones puntuales de **K-RAS** y **p53** son infrecuentes en las lesiones preneoplásicas del carcinoma pulmonar, en comparación con otro tipo de tumores. Sin embargo, sí se ha descrito la presencia de estas anomalías genéticas en material procedente de esputo en pacientes fumadores (42).

En cambio, las **pérdidas alélicas** cromosómicas muestran una tasa de incidencia mucho más elevada en lesiones preneoplásicas. Como en los carcinomas de pulmón ya establecidos, las regiones cromosómicas más frecuentemente implicadas se encuentran en el **3p**, confirmando una vez más su papel en la carcinogénesis pulmonar, y con menos frecuencia en **5q, 9p, 13q y 17p** (43-48). Algunos de estos estudios llegan a la conclusión de que la presencia aislada de alteraciones en algunos de estos cromosomas no tiene relación con el pronóstico. La coincidencia de varias pérdidas alélicas en más de un cromosoma parece poder caracterizar de modo más contundente un elevado riesgo de transformación maligna (48).

OTRAS ALTERACIONES

Otras muchas alteraciones moleculares se han estudiado en las neoplasias de pulmón, con intención de establecer vías de carcinogénesis. Sería muy extenso describirlas todas. Entre ellas cabe destacar alteraciones de microsatélites, metilaciones aberrantes, así como otras alteraciones en los genes relacionados con receptores de factores de crecimiento, receptores autocrinos, ácido retinoico, sobreexpresión de hnRNP (ribonucleoproteínas), proteasas de matriz extracelular, moléculas de adhesión, etc. (2, 5, 15).

SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA: EFECTO CARCINÓGENO DEL TABACO Y HERENCIA

Se estima que el humo del tabaco causa el 90% de tumores de pulmón. Los efectos carcinogénicos del tabaco comprenden la inducción de enzimas potenciadores de este efecto, así como la formación de complejos covalentes con el DNA, que pueden dar lugar a errores en la replicación y a mutaciones. Estas alteraciones se han identificado en el tejido bronquial de pacientes con carcinoma de pulmón, correlacionando sus niveles con la cantidad de exposición al humo del tabaco. De los tres principales carcinógenos del tabaco —hidrocarburos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas— las que muestran mayor poder dañino son algunas nitrosaminas (NNK), derivadas de la metabolización de la nicotina. Se ha sugerido la existencia de **polimorfismos genéti-**

cos que afectan a regiones en las vías de metabolización de estas sustancias, que de modo hereditario darían lugar a diferencias individuales en el riesgo de padecer carcinoma de pulmón asociado al consumo de tabaco. Entre otros, se han descrito polimorfismos en el gen del citocromo p450. A esta familia pertenece la hidroxilasa CYP2D6, que bioactiva la NNK y la nicotina. Estos estudios han sugerido una reducción en el riesgo de padecer carcinoma de pulmón, en pacientes que tienen un genotipo polimórfico determinado asociado a una baja metabolización de estas sustancias (5).

Se han realizado varios estudios en un intento de determinar la existencia de alteraciones de carácter hereditario familiar en el carcinoma de pulmón, asociado o no al consumo de tabaco. Algunos han logrado demostrar una posible herencia mendeliana codominante de un gen autosómico que parece actuar en conjunción con el efecto del tabaco. Todos los estudios sugieren en conjunto que individuos heterocigotos para este posible locus tienen un riesgo mucho mayor de desarrollar cáncer de pulmón en edades precoces, si están expuestos al tabaco, en comparación con aquellos individuos que no presentan esta predisposición genética. La segregación genética en este locus se ha detectado en un 69% de individuos con cáncer de pulmón, con edad por debajo de 50 años, 47% en la quinta década y sólo en un 22% en sujetos por encima de los 70 años (5).

CONCLUSIONES

Aunque algunos autores hayan intentado establecer un modelo de carcinogénesis en el carcinoma de pulmón, aún no están claros los mecanismos de inducción y de progresión tumoral. El estudio de las alteraciones moleculares contribuye a conocer cada vez más este proceso, en conjunción con la morfología, datos clínicos y de exposición a carcinógenos, y la supervivencia. Son necesarios nuevos y más profundos estudios para llegar a establecer los posibles pasos secuenciales en la carcinogénesis pulmonar, así como detectar posibles acumulaciones de alteraciones en aquellos genes clave, entre los que destaca como hemos visto los mapeados en el cromosoma 3. Estos nuevos conocimientos cobran mayor importancia por su potencial papel diagnóstico de lesiones precoces. Un buen método de detección precoz permitirá a su vez abrir otras puertas a nuevas medidas terapéuticas no sólo

como tratamiento sino como posible prevención en pacientes con susceptibilidad demostrada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parker SL, Tong T, Bolden S y cols. *CA Statistics*. Cancer J Clin 1997; 47: 5-27.
2. Minna JD. *The molecular biology of lung cancer pathogenesis*. Chest 1998; 103: 449S-456S.
3. Sekido Y, Fong KM, Minna FD. *Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer*. Biochim Biophys Acta 1998; 1378: F21-F59.
4. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. *Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer*. Cancer Res 1995; 55(1): 28-30.
5. Whang-Peng J, Knutsen T, Gazdar A y cols. *Nonrandom structural and numerical chromosome changes in non-small-cell lung cancer*. Genes Chromosomes Cancer 1991; 3(3): 168-188.
6. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M y cols. *The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer*. Cell 1996; 85(1): 17-26.
7. Sozzi G, Sard L, De Gregorio L y cols. *Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer*. Cancer Res 1997; 57(11): 2121-2123.
8. Chung GTY, Sundaresan V, Hasleton P y cols. *Sequential molecular genetic changes in lung cancer development*. Oncogene 1995; 11: 2591-2598.
9. Hiyama K, Ishioka S, Shirohani Y y cols. *Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and RB*. Oncogene 1995; 10: 937-944.
10. Gazdar AF, Carbone DP. *The biology and genetics of lung cancer*. R.G. Landes Co., Austin 1994.
11. Gómez-Román JJ, Fontalba-Romero A, Sánchez-Castro L y cols. *Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors. Correlation with histologic subtype*. Am J Surg Pathol 2000; 24: 417-421.
12. Shirohani Y, Hiyama K, Ishioka S y cols. *Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer*. Lung Cancer 1994; 11: 29-41.
13. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG y cols. *Neuroendocrine tumors of the lung proposed criteria for large cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases*. Am J Surg Pathol 1991; 15: 529-553.
14. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L y cols. *Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas*. Cancer Res 1997; 57: 2373-2377.
15. Salgia R, Skarin AT. *Molecular abnormalities in lung cancer*. J Clin Oncol 1998; 16: 1207-1217.
16. Slebos R, Rodenhuis S. *The RAS gene family in human non-small-cell lung carcinoma*. JNCI Monogr 1992; 13: 23-29.
17. Greenblatt M, Bennet W, Hollstein M y cols. *Mutations in the p53 suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Res 1994; 54: 4855-4878.
18. Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL y cols. *Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines*. Oncogene 1991; 6: 1353-1362.
19. Slebos R, Kibbeelaar R, Dalesio O y cols. *K-RAS oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung*. N Engl J Med 1990; 323: 561-565.

20. Harada M, Dosaka-Akita H, Miyamoto H y cols. *Prognostic significance of the expression of RAS-oncogene product in non-small-cell lung cancer*. *Cancer* 1992; 69: 72-77.
21. Rosell R, Li S, Skacel Z. *Prognostic impact of mutated K-Ras gene in surgically resected non-small-cell lung cancer patients*. *Oncogene* 1993; 8: 2407-2412.
22. Rodenhuis R, Boerrigter L, Top B y cols. *Mutational activation of the K-Ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: A prospective study*. *J Clin Oncol* 1997; 15: 285-291.
23. Cooper CA, Carey FA, Bubb VJ y cols. *The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung*. *J Pathol* 1997; 181: 401-404.
24. Oshima S, Shimizu Y, Takahama M. *Detection of K-ras gene mutation in paraffin sections of adenocarcinoma and atypical bronchioloalveolar cell hyperplasia of human lung*. *Virchows Arch* 1994; 424: 129-134.
25. Johnson BE, Russell E, Simmons AM y cols. *MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer*. *J Cell Biochem* 1996; Suppl. 24: 210-227.
26. Prins J, De Vries E, Mulder N y cols. *The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumor types*. *Anticancer Res* 1993; 13: 1373-1385.
27. Brennan J, O'Connor T, Makuch R y cols. *Myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small-cell lung cancer with different combination chemotherapy regimens*. *Cancer Res* 1991; 51: 1708-1712.
28. Noguchi M, Hirohata S, Hara F. *Heterogeneous amplification of myc family oncogenes in small-cell lung carcinoma*. *Cancer* 1990; 66: 2053-2058.
29. Fong F, Zimmermann P, Smith P. *Lung pathology: The molecular genetics of non-small-cell lung cancer*. *Pathology* 1995; 27: 295-301.
30. Fong KM, Kida Y, Zimmermann PV y cols. *MYCL genotypes and loss of heterozygosity in non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer* 1996; 74: 1975-1978.
31. Mountain CF. *New prognostic factors in lung cancer – biologic prophets of cancer cell aggression*. *Chest* 1995; 108: 246-254.
32. Kawashima K, Nomura S, Hirai H y cols. *Correlation of the L-MYC RFLP with metastasis, prognosis and multiple cancer in the lung cancer patients*. *Int J Cancer* 1992; 50: 557-561.
33. Stocklin E, Botteri F, Groner B. *An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice*. *J Cell Biol* 1993; 122: 199-208.
34. Kern JA, Slebos RJ, Top B y cols. *C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas*. *J Clin Invest* 1994; 93: 516-520.
35. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE y cols. *p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival*. *Cancer Res* 1990; 50: 5184-5187.
36. Tsai CM, Yu D, Chang KT y cols. *Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations and cell proliferation characteristics in non-small-cell lung cancer cell lines*. *Cancer Res* 1996; 56: 206-209.
37. Pezzella F, Turley H, Kuzu I y cols. *BCL-2 protein in non-small-cell lung carcinoma*. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-694.
38. Xu H, Hu S, Cagle P y cols. *Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinoma*. *Cancer Res* 1991; 51: 2735-2739.
39. Shimizu E, Coxon A, Otterson G y cols. *RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma*. *Oncogene* 1994; 9: 2441-2448.
40. Dalquen P, Sauter G, Torhorst J y cols. *Nuclear p53 overexpression is an independent prognostic parameter in node-negative-non-small cell lung carcinoma*. *J Pathol* 1996; 178: 53-58.
41. Merlo A, Herman JG, Mao L y cols. *5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. *Nature Med* 1995; 1: 686-692.
42. Mao L, Hurban RH, Boyle JO y cols. *Detection of oncogene mutations in sputum precede diagnosis of lung cancer*. *Cancer Res* 1994; 54: 1634-1637.
43. Chung GTY, Sundaresan V, Hasleton P y cols. *Clonal evolution of lung cancer*. *Cancer Res* 1996; 56: 1609-1614.
44. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K y cols. *Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma*. *JAMA* 1995; 273: 558-563.
45. Kishimoto Y, Sukio G, Hung JY y cols. *Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers*. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1224-1229.
46. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P y cols. *p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus*. *Oncogene* 1992; 7: 1989-1997.
47. 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.
48. 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.

