

Desarrollo de la técnica de FICTION como nueva herramienta para el diagnóstico precoz de cáncer de pulmón

FICTION as a new tool to early lung cancer diagnosis

I. Zudaire^{1,2}, R. Pío^{2,3}, I. Martín-Subero⁴, M.D. Lozano⁵, D. Blanco², J.J. García López⁶, M.D. Otero de Dios¹, N. Rey², J. Zulueta⁶, R. Siebert⁴, M.J. Calasanz¹, L. Montuenga^{2,5}

RESUMEN

El cáncer de pulmón es una de las causas de muerte más frecuentes en el mundo occidental. La supervivencia global de los pacientes no supera el 15% a los 5 años, debido principalmente a que la mayor parte de los casos se diagnostican en estadios avanzados. Además de la prevención primaria, mediante la reducción del consumo de tabaco, son necesarias nuevas tecnologías para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Estudios recientes han demostrado que el TAC helicoidal del tórax es efectivo en la detección de nódulos pulmonares malignos en estadios precoces. En la actualidad se está valorando su eficacia en series amplias de pacientes de alto riesgo.

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de citogenética molecular, el FICTION (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*). Esta técnica permite el análisis simultáneo de marcadores inmunofenotípicos y alteraciones genéticas presentes en las células tumorales. El objetivo de nuestro proyecto es su puesta a punto para el estudio de muestras de esputo y lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón. El fin último es estudiar la posibilidad de que esta técnica pueda ser utilizada, junto con el TAC helicoidal, en programas de detección precoz de cáncer de pulmón, para pacientes de alto riesgo.

En este trabajo presentamos una revisión de la contribución de las distintas técnicas de citogenética al estudio del cáncer de pulmón y la metodología de trabajo que vamos a llevar a cabo en nuestro proyecto.

Palabras clave. Cáncer de pulmón. Detección precoz. Citogenética. FICTION. Esputo. Lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most frequent causes of cancer death in Western countries. Overall 5-year survival rate is lower than 15% mainly due to the late diagnosis of the disease. Primary prevention (reduction of tobacco consumption) and more effective methods for early detection are needed.

Some studies have recently shown that low-dose spiral computed tomography (CT) is a useful technique to the detection of pulmonary malignant nodules in early stages. Studies are developing to evaluate its efficacy in series of high-risk patients.

A new cytogenetic technique has been developed: the FICTION technique (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*). This technique allows the simultaneous study of immunophenotypic markers and genetic abnormalities present in tumour cells. The goal of our project is to optimise this technique in sputum and bronchoalveolar lavage specimens from lung cancer patients. The overall goal of this project is to evaluate the usefulness of this technique, together with the new radiological techniques, in early detection programs of lung cancer in high-risk patients.

In the present study we review the cytogenetic studies on lung cancer carried out in the recent years. We also introduce the basic methodological aspects that will be developed in our project.

Key words. Lung cancer. Early detection. Cytogenetics. FICTION. Sputum. Bronchoalveolar lavage.

ANALES Sis San Navarra 2002; 25 (3): 305-315.

1. Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.
2. Unidad de Carcinogénesis. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona.
3. Departamento de Bioquímica. Universidad de Navarra. Pamplona.
4. Instituto de Genética Humana. Hospital Universitario de Kiel. Kiel, Alemania.
5. Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Universidad de Navarra. Pamplona.
6. Departamento de Neumología. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

Aceptado para su publicación el 4 de septiembre de 2002.

Correspondencia

Isabel Zudaire Ripa
Departamento de Genética
Universidad de Navarra
Irunlarrea s/n
31008 Pamplona
Tfno: 948 425600 Ext. 6214
Fax 948 425649
E-mail: izudaire@unav.es

Becas y ayudas a la investigación:

El proyecto presentado en esta revisión está siendo subvencionado por el Gobierno de Navarra, la Fundación para la Investigación Médica Aplicada y por el Centro Interdisciplinar para la Investigación Clínica del Cáncer (IZKF, Kiel, Alemania).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer en el mundo occidental. Se estima que en el año 2000 se produjeron más de 1.300.000 muertes. A pesar de los importantes avances realizados en el tratamiento de estadios avanzados, la supervivencia global del cáncer de pulmón en las mejores series, sigue siendo menor del 15% a los 5 años¹. Todavía más preocupante es el hecho de que esta supervivencia no haya mejorado sustancialmente desde la década de los 70.

Este estancamiento se debe a múltiples factores pero, en contraste con otras neoplasias epiteliales como el cáncer de mama, no hay duda de que la falta de técnicas de diagnóstico precoz del cáncer de pulmón, ha contribuido a este retraso. Así, aproximadamente 80% de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados cuando la enfermedad está avanzada y sin posibilidades reales de curación. Teniendo en cuenta que tan sólo el 15-20% de los pacientes son diagnosticados en estadio IA, con una supervivencia a los 5 años del 80%, es lógico pensar que si mejorara nuestra capacidad de detectar tumores de forma precoz en personas de alto riesgo, conseguiríamos disminuir la mortalidad por esta enfermedad. La combinación de nuevas tecnologías para la detección precoz del cáncer de pulmón y los crecientes esfuerzos de prevención primaria realizados para reducir la exposición al tabaco, pueden sin duda suponer una mejora sustancial en la batalla por controlar esta epidemia de los tiempos modernos².

Estudios iniciales realizados en los años 70 desaconsejaron la combinación del análisis citológico del esputo y la radiografía de tórax como herramienta para la detección precoz de cáncer de pulmón en pacientes de alto riesgo; sin embargo, estudios recientes han demostrado que el TAC helicoidal del tórax es efectivo en la detección de nódulos pulmonares malignos en estadios precoces³ y puede ser una buena herramienta para estrategias de cribado en poblaciones de alto riesgo. Grupos multicéntricos están llevando a cabo estudios aleatorios para determinar si el uso del TAC helicoidal en protocolos de cribado a

nivel población de alto riesgo disminuye significativamente la mortalidad por cáncer de pulmón.

La línea de investigación que llevamos a cabo en nuestro grupo parte de la hipótesis de que la combinación de las técnicas radiológicas con técnicas de detección de marcadores moleculares permitirá mejorar sustancialmente el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.

Es evidente que, para poder aplicar el estudio de marcadores moleculares en el contexto de la detección precoz en el ámbito poblacional, se requiere desarrollar técnicas poco invasivas, sencillas, rápidas y de bajo coste. Es conocido que a lo largo de la carcinogénesis pulmonar, algunas células del tumor son liberadas al árbol bronquial y pueden detectarse en los correspondientes fluidos biológicos, como el lavado broncoalveolar o esputo^{4,5}. También se ha publicado la detección de células cancerosas, ARN, ADN y proteínas de origen tumoral en la sangre de los pacientes con cáncer de pulmón, especialmente en los tumores más avanzados⁶. La presencia de moléculas del tumor en el suero/plasma del paciente en el caso de estadios más precoces es todavía tema de discusión. La detección de células tumorales o preneoplásicas en esputo o lavado broncoalveolar podría en teoría adelantar el diagnóstico del tumor antes de la aparición de los síntomas clínicos, o complementar los datos obtenidos mediante el TAC helicoidal, por lo que resultan de gran interés para la puesta en marcha de un programa de detección precoz.

El análisis citológico es la técnica convencional para el estudio de la presencia de células malignas en el esputo o el lavado broncoalveolar. En teoría, en estadios muy precoces de la carcinogénesis pulmonar, es posible encontrar en estos fluidos biológicos células fenotípicamente normales que presenten marcadores moleculares específicos de la transformación o de pre-malignidad. Por ello, un estudio multidisciplinar de las muestras que combine el estudio fenotípico y de marcadores moleculares, puede mejorar significativamente la calidad del diagnóstico.

En este contexto, el objetivo principal de nuestro proyecto es la puesta a punto de una nueva tecnología diagnóstica, la técnica de FICTION (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*)⁷ para el estudio de células exfoliativas presentes en el esputo y el lavado broncoalveolar de pacientes con alto riesgo de padecer cáncer de pulmón.

Para comprender mejor la necesidad del desarrollo de esta técnica en carcinomas de pulmón, exponemos brevemente la contribución de las distintas técnicas de citogenética al estudio de esta neoplasia.

CITOGENÉTICA EN CÁNCER DE PULMÓN

Citogenética convencional

El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas presentes en las metafases de las células obtenidas a partir de un cultivo *in vitro* del tejido a estudiar. El estudio de la morfología de los cromosomas se lleva a cabo mediante el tratamiento con tripsina y posterior tinción con Giemsa, generando un patrón de bandas, denominadas bandas G, que permite detectar las alteraciones, tanto numéricas como estructurales, presentes en el genoma⁸.

La citogenética convencional ha experimentado un importante desarrollo en el campo de la hematología, incorporándose a la rutina diagnóstica; sin embargo en el caso de los tumores sólidos, las dificultades técnicas encontradas la han relegado al campo de la investigación. Los principales problemas residen en la escasa disponibilidad de tejido fresco, la contaminación de los cultivos *in vitro* por células normales, el bajo índice mitótico del tumor *in vitro* y principalmente, debido al tiempo de manifestación clínica de los tumores, la complejidad de los cariotipos, que impide identificar alteraciones cromosómicas específicas de un grupo diagnóstico o con una evolución clínica determinada⁹.

A pesar de todo, la citogenética convencional ha permitido describir alteraciones específicas de los distintos tipos his-

tológicos de cáncer de pulmón. Así los carcinomas microcíticos o de células pequeñas (*Small Cell Lung Carcinoma*; SCLC) se caracterizan por las pérdidas en 3p, 5q, 13q y 17p. En carcinomas no microcíticos o de células no pequeñas (*Non-Small Cell Lung Carcinoma*; NSCLC) son frecuentes las pérdidas en 3p, 9p, 17p, la trisomía del cromosoma 17 y la presencia de i(5)(p10) e i(8)(q10). Dentro de este subgrupo, la pérdida de 3p y los reordenamientos afectando a 2p y 3q son significativamente más frecuentes en carcinomas escamosos (*Squamous Cell Carcinoma*; SCC) que en adenocarcinomas (ADC), en los que son más frecuentes las ganancias en 1q, 7p y 11q¹⁰⁻¹².

Algunas de estas alteraciones se han asociado a factores pronósticos tradicionales; así Feder y col encontraron que en NSCLC los reordenamientos en 17p se asociaban a tumores de menor grado. Asimismo, las reordenaciones en Xq y las pérdidas de los cromosomas 4 ó 22 se asociaban a peor pronóstico¹².

Ya en 1993, la citogenética convencional hizo su primera aportación al estudio de células exfoliativas de pulmón. El trabajo de Lukeis y col describió alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales en efusiones pleurales de 11 pacientes con NSCLC. Las alteraciones más frecuentes fueron las reordenaciones afectando a la banda 1p10-p13, las ganancias de los cromosomas 7 y 20, y las pérdidas de 4, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 19, 21 y 22¹³.

Citogenética molecular

La citogenética molecular engloba a todas las técnicas cromosómicas basadas en la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes. En función de la sonda utilizada y la diana que se pretende estudiar se han desarrollado diferentes metodologías: FISH, CGH, SKY, M-FISH, etc. y finalmente el FICTION.

FISH convencional

Se consideran técnicas de FISH convencional, aquellas técnicas que utilizan sondas de ADN normal marcadas con fluorescencia sobre metafases o núcleos en interfase procedentes del tumor. La posibilidad de estudiar núcleos en interfase abre

un enorme campo al estudio de tumores con un bajo índice mitótico y al estudio de material archivado, bien congelado o incluido en parafina⁸.

Al igual que la citogenética convencional, las técnicas de FISH permiten detectar todo tipo de alteraciones, tanto numéricas como estructurales. Uno de sus inconvenientes es que sólo permite estudiar aquella secuencia para la que se dispone sonda, quedando el resto del genoma oculto.

La región más frecuentemente analizada mediante FISH en cáncer de pulmón ha sido 3p. En este brazo, se han descrito deleciones frecuentes en diferentes regiones como 3p25-p26, 3p21.3-p22, 3p14 y 3p12¹⁴. El gen *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*) en 3p14.2 es uno de los genes más estudiados. Se han descrito transcritos anómalos de este gen en un 80% de los SCLC y en un 40% de los NSCLC. 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 tabaco¹⁵. Además, la LOH no es exclusiva de células tumorales: se ha descrito alteración de este gen en el epitelio morfológicamente normal de fumadores y mediante FISH, Caballero y col describieron la pérdida de este gen en el epitelio normal de pacientes con tumores primarios¹⁶. Su implicación en los estadios iniciales del desarrollo del tumor se confirma con la descripción de deleciones en lesiones preneoplásicas como la fibrosis idiopática pulmonar¹⁷.

La elevada frecuencia de deleciones en 3p21 ha generado multitud de estudios en busca de posibles genes supresores localizados en esta región. Estudios mediante RFLPs, RT-PCR y marcadores de LOH¹⁸⁻²⁰ han sugerido el posible papel supresor de varios genes localizados en 3p21.3. Así, se han descrito deleciones homocigóticas en una región de 120kb en 3p21.3 afectando a *CACNA2D2*, *101F6*, *NPRL2*, *BLU*, *FUS1*, *HYAL2*, *HYAL1*, *SEMA3B*, *SEMA3F* y *RBM5/H37* entre otros^{21,22}. 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 el caso de ser supresores tumorales, la vía de inactivación no es la mutación genó-

mica. 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)²³, *RARB*, *TIMP-3*, *CDKN2A/p16*, *MGMT*, *DAPK*, *ECAD*, *GSTP1* y también *FHIT*¹⁵. En el caso de *CDKN2A/p16*, se ha descrito también metilación en un 92% de las muestras de esputo obtenidas de pacientes con NSCLC²⁴, por lo que el estudio de la metilación de este gen se ha propuesto como herramienta de detección precoz.

El brazo largo del cromosoma 3 también ha sido objeto de estudio mediante FISH, confirmando la implicación de múltiples genes en las ganancias encontradas en 3q25-q27 en carcinomas escamosos²⁵. En 3q21, se ha identificado un posible oncogén, *AIS*, frecuentemente amplificado en este tipo histológico²⁶.

La primera y, hasta la fecha, única participación de la citogenética en el diagnóstico de los tumores sólidos ha sido el estudio de la amplificación del oncogén *ERBB2* (17q12) mediante FISH. ErbB2 es una proteína transmembrana con actividad tirosín kinasa, cuya sobreexpresión se ha descrito en multitud de tumores, principalmente en carcinomas de mama. En esta neoplasia, la sobreexpresión de la proteína se asocia a un peor pronóstico²⁷. Recientemente se ha desarrollado un tratamiento específico para los casos ErbB2 positivos, un anticuerpo monoclonal denominado Trastuzumab (Herceptin), que en combinación con la quimioterapia tradicional mejora significativamente la supervivencia de los pacientes. Debido a los importantes efectos cardiotoxicos derivados del tratamiento y su elevado coste, es esencial conseguir una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la sobreexpresión de ErbB2. En mama, la sobreexpresión de la proteína es resultado de la amplificación del gen en un 80% de los casos, por lo que la combinación del análisis inmunohistoquímico rutinario de la proteína y la confirmación mediante FISH de los casos de sobreexpresión dudosa ha mejorado sensiblemente la calidad del diagnóstico²⁸.

La sobreexpresión de ErbB2 en cáncer de pulmón se ha descrito principalmente en NSCLC con porcentajes que varían entre el 5 y 50%, siendo mucho más frecuente en ADC y carcinomas de células grandes (*Large Cell Carcinoma*; LCC) que en SCC²⁹. La sobreexpresión en SCLC ha sido mucho menos estudiada, con porcentajes entre el 13 y el 30%^{30,31}. A diferencia de lo que ocurre en mama, existe una importante controversia respecto a la implicación de ErbB2 en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. En el estudio de 187 NSCLC llevado a cabo por Hirsch y col²⁹ no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los paciente positivos y negativos para la sobreexpresión de la proteína, aunque se observó una ligera menor supervivencia en los pacientes con niveles 3 de sobreexpresión³². Sin embargo, Potti y col en el estudio de 223 SCLC sí describieron una menor supervivencia en los pacientes ErbB2 positivos³⁰.

Los primeros estudios mediante FISH de la amplificación del gen *ERBB2* muestran que, a diferencia del cáncer de mama, la amplificación del gen en pulmón es muy poco frecuente (solo un 4% en NSCLC), de forma que sólo un 25% de los casos positivos para la sobreexpresión presentan amplificación del gen. La polisomía del cromosoma 17 es muy frecuente en NSCLC (alrededor de un 84% de los casos) y ésta parece no corresponderse con la sobreexpresión de la proteína^{32,33}. La implicación de este gen en el pronóstico del cáncer de pulmón todavía no se ha estudiado.

No hay estudios de amplificación en tumores primarios de SCLC pero sí en líneas celulares donde no se han descrito la amplificación de *ERBB2*³⁴.

No se ha desarrollado un protocolo estándar en pulmón que defina los criterios para la evaluación inmunohistoquímica y/o mediante FISH de este gen. Sin embargo, ya se están desarrollando ensayos en fase II y en fase III en pacientes con NSCLC con Trastuzumab en combinación con los tratamientos estándar de quimioterapia²⁹. Los primeros resultados indican que los pacientes con NSCLC y niveles 3 de sobreexpresión y/o amplificación del gen

presentan una mayor respuesta al tratamiento y mayor supervivencia; sin embargo, dado el escaso número de pacientes con estas características, los resultados son poco esclarecedores³⁵.

Otros genes estudiados mediante la técnica de FISH en pulmón han sido *MLL* (11q23), cuya amplificación se ha asociado con resistencia al tratamiento con inhibidores de la *TOP2II α* ³⁶ y un posible gen relacionado con la represión de la expresión de la telomerasa en 10p15.1³⁷.

Hibridación Genómica Comparada (CGH)

Debido a los problemas técnicos de la citogenética convencional, una nueva técnica ha experimentado un enorme auge entre los tumores sólidos: la CGH. El fundamento de esta técnica es el marcaje del ADN en estudio mediante un fluorocromo de emisión verde y de un ADN normal de referencia con un fluorocromo de emisión roja. Mezclados en cantidades equimoleculares, los dos ADNs se utilizan como sondas en la hibridación sobre una metafase normal. Cuando existe ganancia de material en la muestra test, en un cromosoma (o en parte de él) se detectará en esa zona una mayor intensidad verde; será roja en el caso de la detección de pérdidas. La cuantificación de esa diferencia de intensidades se realiza mediante un equipo informático que calcula el cociente de intensidades verde/rojo a lo largo de cada cromosoma de la metafase³⁸. Al igual que la citogenética convencional, y a diferencia del FISH convencional, la CGH tiene la ventaja de que proporciona información de todo el genoma en un único experimento de hibridación. Además, permite trabajar con el ADN del tumor sin tener que recurrir al tejido fresco. Su gran inconveniente es, sin embargo, el hecho de detectar únicamente ganancias y pérdidas, pero no alteraciones equilibradas como translocaciones o inversiones.

Los trabajos de CGH en pulmón publicados hasta el momento describen alteraciones recurrentes en un gran número de cromosomas. En el carcinoma escamoso son frecuentes las pérdidas en 2q, 3p, 3q, 4q, 7p, 9q, 13q, 16q, 17p y 21q, así como las ganancias en 3q. Las ganancias en 1q23,

7p, 15q y 20q y la delección en 6q, 13q, 18q y 19q22 se han asociado a adenocarcinomas³⁹. Los carcinomas de células pequeñas se caracterizan por pérdidas en 3p, 13q14-q21, 4p, 4q y 2q22-q24, mientras las ganancias afectan principalmente a 19p, 19q, 1p31-p35, 17q22-q25 y 5p14-p15.3. De especial interés es la descripción de regiones amplificadas en 1p32-p33 y 2p22-p24. En 1p32 se localiza el gen *LMYC* y en 2p24.1 *NMYC*, dos genes cuyas proteínas están sobrepresadas en este tipo histológico⁴⁰.

En otro trabajo posterior, Petersen y col describieron como alteraciones asociadas al proceso metastático las pérdidas en 3p12-p14, 3p21, 4p15-p16, 6q24-qter, 8p22-p23, 10q21-qter y 21q22, y las ganancias en 1q21-q25, 8q, 9q34, 14q12 y 15q12-q15⁴¹.

La CGH también ha permitido describir alteraciones asociadas a quimiorresistencia. Amplificaciones en 11q23-qter, la pérdida del cromosoma 17 y delecciones en 2p14-pter y 2q23-q24 se presentan de forma específica en líneas celulares resistentes al tratamiento con VP16, un inhibidor de la Topoisomerasa II α ³⁶.

A pesar de todas estas ventajas, la CGH solamente se ha utilizado en el campo de la investigación. Es una técnica compleja, laboriosa, de elevado coste y que requiere personal altamente cualificado, lo que hace inviable su utilización como técnica de cribado.

SKY y M-FISH

Las técnicas de cariotipo spectral (SKY)⁴² y multi-FISH⁴³ están basadas en el pintado de los cromosomas del tumor con una mezcla de 24 sondas fluorescentes que permiten identificar cada cromosoma por su color específico. Presenta todas las ventajas de la citogenética convencional, con la ventaja añadida de permitir caracterizar translocaciones complejas y reordenamientos crípticos que se escapan a la resolución de las bandas G. En tumores sólidos, su uso es limitado por la necesidad de trabajar con metafases de alta calidad obtenidas del tumor fresco. En pulmón la técnica de M-FISH se ha utilizado en el estudio de líneas celulares de NSCLC⁴⁴. Los resultados obtenidos son de gran interés ya que, mostraron como en pulmón, a diferencia de lo que ocurre en las neoplasias

hematológicas, son muy poco frecuentes las translocaciones equilibradas, mientras que se describieron un gran número de alteraciones numéricas y estructurales no equilibradas.

FLECTION

La técnica de FLECTION consiste en la detección simultánea de antígenos celulares mediante inmunofluorescencia y de alteraciones cromosómicas mediante la técnica de FISH en un solo experimento de hibridación. El desarrollo de nuevas sustancias fluorescentes y nuevos sistemas de filtros ha permitido la puesta en marcha de una variante, el M-FLECTION, con el que pueden llegar a detectarse simultáneamente hasta 5 alteraciones cromosómicas⁴⁵. En el artículo de Martín Subero y col publicado en esta revista se detalla el fundamento técnico del FLECTION⁴⁶.

El FLECTION es una técnica mucho más rápida y menos compleja que la citogenética convencional o el CGH. Además, dado el bajo porcentaje de células tumorales que cabe esperar en las muestras de esputo y lavado bronquial, la técnica del FLECTION resulta más apropiada por su elevada sensibilidad. En comparación con el FISH, el FLECTION aporta la ventaja de poder identificar el tipo celular que lleva la alteración citogenética, en medio de una población heterogénea de células.

Tal y como se ha mostrado en el artículo de Martín Subero y col, el FLECTION ha resultado de gran utilidad en el estudio de neoplasias hematológicas. Sin embargo, sólo se ha publicado un trabajo en tumores sólidos en el que se ha estudiado la relación existente entre la expresión del receptor de estrógenos y la delección del gen en 6 líneas celulares de cáncer de mama⁴⁷. No existe ningún trabajo previo de FLECTION en carcinomas pulmonares.

ESTUDIOS CON TECNOLOGIA MICROARRAY

Las nuevas tecnologías de microchips también han sido puestas al servicio del cáncer de pulmón. Uno de los esfuerzos más importantes realizados ha sido el estudio de Garber y col. El estudio de la expresión de 24.000 elementos en un microarray de cDNA les permitió describir

tres subgrupos de adenocarcinomas, con patrones de expresión diferentes y diferencias significativas en la supervivencia⁴⁸.

ESTUDIOS Y RESULTADOS PREVIOS OBTENIDOS HASTA LA FECHA

Tal y como hemos señalado anteriormente, el objetivo de nuestro grupo de trabajo es la puesta a punto de la técnica de FICTION para el estudio de células exfoliativas en esputo y lavado broncoalveolar.

Para este proyecto, se han seleccionado pacientes diagnosticados de carcinoma primario de pulmón en estadios que permitan su resección quirúrgica.

Después de obtener el correspondiente consentimiento informado, de cada paciente se han obtenido muestras de tumor primario, tejido "normal" adyacente, tejido normal distante, lavado broncoalveolar, esputo y sangre. Como muestras control, muestras de esputo y sangre de individuos sanos y tejido pulmonar normal de autopsias por traumatismos. Los miembros clínicos del equipo de investigación se encargan de llevar a cabo esta parte del proyecto.

El primer paso para la puesta a punto de la técnica de FICTION es la optimización de protocolos de recogida de las muestras. Es imprescindible que la recogida se realice de forma estandarizada, de forma que los resultados del ensayo no se vean modificados por variaciones en los tiempos y procedimientos de extracción y conservación.

En segundo lugar, es imprescindible la identificación de un marcador citoplasmático que permita identificar las células tumorales entre la población de células epiteliales normales, macrófagos, linfocitos, células orales, etc., que pueden presentarse en las muestras. Con este objetivo, nuestro grupo está investigando el papel de miembros de la familia hnRNP, miembros de la familia de cadherinas y factores de crecimiento o sus receptores como potenciales marcadores específicos para el fenotipo tumoral.

En tercer lugar, la selección de los marcadores genéticos objeto de estudio. Basándonos en las alteraciones genéticas

recurrentes en cáncer de pulmón conocidas por la bibliografía (Tabla 1), nuestro objetivo es el estudio de las regiones 3p, 9p21 (*P16*), 17p13 (*TP53*), 13q14 (*RB1*), 8q24 (*CMYC*) y 2p23-24 (*NMYC*). Para alguna de ellas existen sondas comerciales como *TP53*, *RB1*, *CMYC* y *NMYC*. Sin embargo, no están disponibles comercialmente sondas para otras regiones. Utilizando los recursos bioinformáticos derivados del proyecto genoma humano, hemos diseñado sondas de ADN para el estudio de los genes *VHL* en 3p25.3, *MLH1* en 3p22.3, *PCBP4* en 3p21.1, *FHIT* en 3p14.2, *DUTTI* en 3p12.1 y *CDKN2A/p16* en 9p21.

Los primeros ensayos realizados se han llevado a cabo sobre líneas celulares de cáncer de pulmón. Esto ha permitido establecer las condiciones de fijación, tiempo y temperatura de los distintos pasos de la técnica de FICTION. En la figura 1 se muestra una imagen de FICTION sobre células de la línea celular de ADC pulmonar H23. El antígeno de superficie utilizado fue el pull de citoqueratinas MNF116; para el estudio del número de cromosomas 17 se utilizó una sonda alfa satélite de dicho cromosoma de Q-Biogene y como sonda para el estudio del *gen TP53* se utilizaron los BACs RPCI-11 199F11 y RPCI-11 404G1.

Actualmente hemos comenzado a poner a punto la tecnología FICTION en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes, utilizando sondas dirigidas contra algunas de las regiones mencionadas más arriba. Asimismo, estamos llevando a cabo estudios correlativos de esos marcadores genéticos, en concreto los localizados en 3p, entre las muestras de células exfoliativas y las biopsias de los respectivos tumores pulmonares incluidas en parafina.

APLICACIONES PREVISTAS

Este proyecto se enmarca dentro de un proyecto financiado por el V Programa Marco de la UE en el que participan un total de 11 centros, representando a siete países (España, Reino Unido, Francia, Dinamarca, Holanda, Italia y Alemania). Su objetivo es la identificación de marcadores moleculares para la detección precoz del

Tabla 1. Resumen de las alteraciones citogenéticas más frecuentes descritas en cáncer de pulmón y los genes presentes en las regiones afectadas.

TIPO HISTOLÓGICO*	PÉRDIDAS	GENES	GANANCIAS	GENES	
NSCLC SCC	2q		3q	<i>AIS</i>	
	3p12.1	<i>DUTT1</i>	5p		
	3p14.2	<i>FHIT</i>	8q		
	3p21.1	<i>PCBP4, ACY1, BAP1</i>	17	<i>ERBB2</i>	
	3p21.31	<i>RASSF1A, HMLH1, SEMA3B/SEMA3F, FUS1, CACNA2D2, H37/RBM5, 101F6</i>			
	3p24	<i>RARb</i>			
	3p25	<i>VHL, hOGG1</i>			
	3q				
	4q				
	7p				
	9p	<i>CDKN2A/ p16</i>			
	9q				
	13q				
	16q				
	17p	<i>TP53</i>			
	21q				
	ADC	6q		1q	
		13q	<i>RB1</i>	7p	<i>EGFR</i>
		18q	<i>BCL2</i>	11q23-qter	<i>MLL</i>
19q22			15q		
			20q		
SCLC	2q22-q24		1p31-p35	<i>LMYC</i>	
	3p		2p22-p24	<i>NMYC</i>	
	4p		5p14-p15.3		
	4q		8q	<i>CMYC</i>	
	13q14-q21	<i>RB1</i>	17q22-q25		
			19p	<i>NOTCH3</i>	
		19q			

*NSCLC: Non-Small Cell Lung Carcinoma. SCC: Squamous Cell Carcinoma. ADC: Adenocarcinoma. SCLC: Small Cell Lung Carcinoma.

cáncer de pulmón en individuos de alto riesgo. El estudio se está llevando a cabo con pacientes que ya han sufrido un primer cáncer de pulmón o de cabeza y cuello. La razón de ello es que el riesgo de estos pacientes de desarrollar un nuevo tumor pulmonar es muy alto, de 1 al 3% anual. El proyecto europeo propone la recogida de muestras a partir de más de 1.000 individuos con alto riesgo de presen-

tar un segundo tumor primario de pulmón (unos 100 por cada centro que forma parte del proyecto) y hacer su seguimiento durante 5 años para estudiar periódicamente en ellos una batería de marcadores y técnicas de detección. El objetivo final es determinar los marcadores que puedan predecir la aparición de un segundo tumor primario de pulmón.

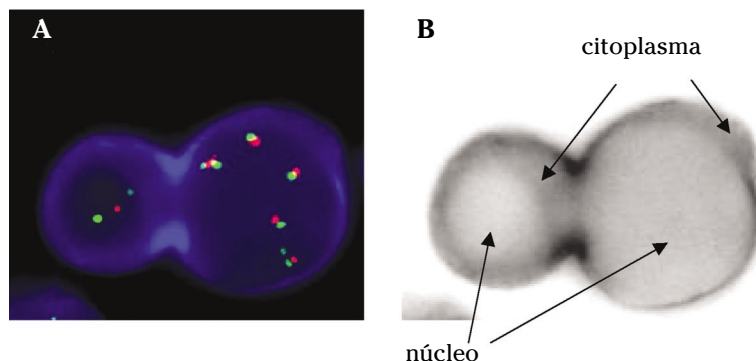


Figura 1. (A) Imagen de FICTION sobre la línea celular de ADC H23. La tinción azul corresponde al antígeno de superficie MNF116. La señal roja corresponde al gen *TP53* y la verde al cromosoma 17. (B) Imagen en blanco y negro resultado de la inversión del color de la figura 1.A, que permite distinguir el contorno nuclear.

Por ahora, ninguno de los biomarcadores que se han estudiado en cáncer de pulmón ha sido validado en series suficientemente numerosas de pacientes. La cooperación entre un número tan importante de centros es, por lo tanto, esencial para conseguir una serie con el suficiente tamaño como para obtener resultados estadísticamente significativos. Además, el estudio de un número alto de pacientes permitirá estandarizar los protocolos de recogida, procesamiento, almacenamiento y análisis de las muestras.

Los resultados preliminares son alentadores; es de esperar que los nuevos hallazgos permitan disponer de herramientas eficaces para una detección más precoz del carcinoma pulmonar. El desarrollo de nuevos biomarcadores puede complementar la eficacia de las estrategias radiológicas para la detección precoz, que están ya siendo evaluadas en ensayos randomizados. Si finalmente se demuestra que los protocolos de detección precoz reducen la mortalidad por cáncer de pulmón, se habrá dado un paso de gigante en la batalla contra la epidemia de cáncer de pulmón que está viviendo la sociedad occidental desde mediados del siglo XX.

BIBLIOGRAFÍA

1. PASTORINO U. Lung cancer: diagnosis and surgery. *EJC* 2001; 37 (7 Suppl): 75S-90S.

2. ZULUETA J, MONTUENGA JM. Detección precoz de cáncer de pulmón: el momento oportuno. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 460-462.

3. HENSHCKE CI, MACCAULEY DI, YANKELEVITZ DF, NAIDICH DP, MCGUINNESS G, MIETTINEN OS et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354: 99-105.

4. SACCOMANNO GA, AUERBACH O, SAUNDERS RP, BRENNAN LM. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer (Phila)* 1974; 32: 256-370.

5. TOCKMAN MS, MULSHINE JL. The early detection of occult lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 2000; 10: 737-749.

6. SOZZI G. Molecular biology of lung cancer. *EJC* 2001; 37 (7 Suppl): 63S-73S.

7. WEBER-MATTHIEN K, WINKEMANN M, MÜLLER-HERMELINK A, SCHLEGELBERGER B, GROTE W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 171-175.

8. CALASANZ MJ. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *ANALES Sis San Navarra* 2001; 24: 17-29.

9. JAMES LA. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 1999. 187: 385-395.

10. JOHANSSON M, JIN Y, MANDAHN N, HAMBRAEUS G, JOHANSSON L, MITELMAN F et al. Cytogenetic analysis of short-term cultured squamous cell carcinomas of the lung. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 81: 46-55.
11. 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; 95: 20-32. Review.
12. FEDER M, SIEGFRIED JM, BALSHEM A, LITWIN S, KELLER SM, LIU Z et al. Clinical relevance of chromosome abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 102: 25-31.
13. 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; 8: 262-269.
14. HIBI K, TAKAHASHI T, YAMAKAWA K, UEDA R, SEKIDO Y, ARIYOSHI Y et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 1992; 7: 445-449.
15. ZÖCHBAUER-MÜLLER S, GAZDAR AF, MINNA JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 681-708.
16. CABALLERO OL, COHEN D, LIU Q, ESTELLER M, BONACUM J, WHITE P et al. Loss of chromosome arms 3p and 9p and inactivation of P16 (INK4a) in normal epithelium of patients with primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 119-125.
17. 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; 61: 8527-8533.
18. JI L, NISHIZAKI M, GAO B, BURBEE D, KONDO M, KAMIBAYASHI C et al. Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62: 2715-2720.
19. WISTUBA II, BEHRENS C, VIRMANI AK, MELE G, MILCHGRUB S, GIRARD L et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000; 60: 1949-1960.
20. GIRARD L, ZÖCHBAUER-MÜLLER S, VIRMANI AK, GAZDAR AF, MINNA JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* 2000; 60: 4894-4906.
21. 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; 62: 3207-3213.
22. 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; 62: 2637-2643.
23. 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; 20: 3563-3567.
24. CHEN JT, CHEN YC, WANG YC, TSENG RC, CHEN CY, WANG YC. Alterations of the p16(ink4a) gene in resected nonsmall cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer* 2002; 98: 724-731.
25. KETTUNEN E, EL-RIFAI W, BJORKQVIST AM, WOLFF H, KARJALAINEN A, ANTILA S et al. A broad amplification pattern at 3q in squamous cell lung cancer—a fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117: 66-70.
26. HIBI K, TRINK B, PATTURAJAN M, WESTRA WH, CABALLERO OL, HILL DE et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5462-5467.
27. HAYES DF, THOR AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol* 2002; 29: 231-245.
28. McCORMICK SR, LILLEMÖE TJ, BENEKE J, SCHRAUTH J, REINARTZ J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 935-943.
29. HIRSCH FR, FRANKLIN WA, BUNN PA JR. What is the role of Her-2/neu and trastuzumab (Herceptin) in lung cancer? *Lung cancer* 2002; 36: 263-264.
30. POTTI A, WILLARDSON J, FORSEEN C, KISHOR GANTI A, KOCH M, HEBERT B et al. Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2002; 36: 257-261.
31. MICKE P, HENGSTLER JG, ROS R, BITTINGER F, METZ T, GEBHARD S et al. c-erbB-2 expression in

- small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001; 92: 474-479.
32. HIRSCH FR, VARELLA-GARCÍA M, FRANKLIN WA, VEVE R, CHEN L, HELFRICH B et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 2002; 86: 1449-1456.
 33. COX G, VYBERG M, MELGAARD B, ASKAA J, OSTER A, O'BYRNE KJ. Herceptest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001; 92: 480-483.
 34. BUNN PA JR, HELFRICH B, SORIANO AF, FRANKLIN WA, VARELLA-GARCÍA M, HIRSCH FR et al. Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to *in vitro* cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3239-3250.
 35. ZINNER RG, KIM J, HERBST RS. Non-small cell lung cancer clinical trials with trastuzumab: their foundation and preliminary results. *Lung Cancer* 2002; 37: 17-27.
 36. STRUSKI S, DOCO-FENZY M, TRUSSARDI A, MASSON L, GRUSON N, ULRICH E et al. Identification of chromosomal loci associated with non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to topoisomerase II inhibitor in lung adenocarcinoma cell line by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 136-142.
 37. MIURA N, ONUKI N, RATHI A, VIRMANI A, NAKAMOTO S, KISHIMOTO Y et al. hTR repressor-related gene on human chromosome 10p15.1. *Br J Cancer* 2001; 85: 1510-1514.
 38. KALLIOMIEMI A, KALLIOMIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
 39. 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; 125: 87-99.
 40. LUI WO, TANENBAUM DM, LARSSON C. High level amplification of 1p32-33 and 2p22-24 in small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 2001; 19: 451-457.
 41. PETERSEN S, ANINAT-MEYER M, SCHLUNS K, GELLERT K, DIETEL M, PETERSEN I. Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer* 2000; 82: 65-73.
 42. SHROCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, SHOELL B, WIENBERG J, FERGUSON-SMITH MA et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.
 43. SPEICHER MR, GWYN-BALLARD S, WRAD DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 368-375.
 44. 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 multicolour bar coding. *Lab Invest* 2000; 80: 1031-1041.
 45. MARTIN-SUBERO JI, CHUDOBA I, HARDER L, GESK S, NOVO FJ, CALASANZ MJ et al. Multicolor-FICTION: Expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic and genetic single cell analyses. *Am J Pathol* (en prensa).
 46. MARTIN-SUBERO I, SIEBER R, CALASANZ MJ. FICTION convencional y multicolor como herramientas para el estudio interdisciplinar de las neoplasias hematológicas. Enviado a ANALES Sis San Navarra.
 47. ZHANG Y, SIEBERT R, MATTHIENEN P, HARDER S, THEILE M, SCHERNECK S et al. Feasibility of simultaneous fluorescence immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization study for the detection of estrogen receptor expression and deletions of the estrogen receptor gene in breast carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 2000; 436: 271-275.
 48. GARBER ME, TROYANSKAYA OG, SCHLUENS K, PETERSEN S, THAESLER Z, PACYNA-GENGELBACH M et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13784-13789.

