

Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón

L. Callol Sánchez y F.J. Gómez de Terreros y Sánchez*

Servicio de Neumología. *Jefatura de Docencia e Investigación. Hospital Universitario del Aire. Madrid.

Introducción

El cáncer de pulmón ha pasado de ser una entidad prácticamente desconocida y citada como una curiosidad por Paracelso en 1422 (*Bergkrankheit*) a ser la primera causa de muerte por tumor en el varón y la segunda en la mujer. De hecho, la primera descripción de la naturaleza maligna de la enfermedad la llevó a cabo Hesse en 1879, filianádola erróneamente como un sarcoma pulmonar¹.

La suma de los casos diagnosticados anualmente en los EE.UU. y en la UE ascienden a cerca de 300.000², siendo la causa de 1.000.000 de fallecimientos anuales en todo el mundo³. En la actualidad el diagnóstico de cáncer de pulmón equivale a una sentencia de muerte a corto plazo para una gran parte de los pacientes. La supervivencia a cinco años es menor del 15% en el total de enfermos⁴⁻⁶. Este pequeño porcentaje se debe a la incapacidad para realizar un diagnóstico precoz en un estadio en el cual el tratamiento pudiera curar una enfermedad todavía localizada. En buena parte, el derrotismo y la resignación han favorecido el mantenimiento de estas tasas exiguas de supervivencia. La llave para romper esta dinámica está en el diagnóstico precoz apoyado en nuevas técnicas aplicadas a la citología de esputo, a la imagen o a la moderna endoscopia⁷.

La política sanitaria actual no está a favor de llevar a cabo programas de diagnóstico de las conclusiones de cuatro estudios aleatorizados de amplia influencia mundial llevados a cabo en la década de los setenta. Sin embargo, hay muchos datos esperanzadores en los resultados de estos trabajos que obligan a replantearse sus conclusiones y su valor clínico.

El estudio clásico cooperativo de la Clínica Mayo, de la John Hopkins University y del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, llevado a cabo sobre 30.000 personas de "alto riesgo", en un intento de aprovechar experiencias previas de diagnóstico precoz^{8,9}, realizando un cuestionario y un examen anual, una radiografía de tórax y una citología de esputo cada 4 meses, concluyó que la prevalencia varía del 4,6 al 8 por mil según el

centro. La mayor parte de las veces fue positiva la radiografía sola o se acompañó de una citología positiva. En algunos casos fue ésta la única muestra diagnóstica. En los casos que fueron diagnosticados precozmente el tratamiento quirúrgico lograba una supervivencia muy superior a los diagnosticados con protocolos habituales y, desde luego, por encima de los alcanzados en anteriores estudios¹⁰, que, según algunos autores, llegaba a ser de 80% a los cinco años, con un 83% de casos reseca- bles. Los resultados obtenidos por otros métodos, básicamente clínicos, sólo alcanzan una supervivencia del 10%¹¹. En los estudios citados anteriormente^{12,13} se consiguió una incidencia de diagnóstico de un 28,7 y de un 31,7%, respectivamente, más alta en el grupo de estudio que en el grupo control.

Existen "seudovariables" que dan sesgo especial a los estudios aleatorizados y que deben tenerse en cuenta a la hora de su interpretación¹⁴. Dado que en el transcurso de los mismos muy pocos enfermos mueren por cáncer de pulmón, la mortalidad no es un buen índice para evaluar la rentabilidad del diagnóstico precoz. Ha sido este parámetro, precisamente, el utilizado para restar valor a estos estudios. Por otra parte, las muestras recogidas se refieren, sobre todo, a casos de crecimiento indolente, con relativamente buen pronóstico. Así pues, es probable que pequeñas variaciones en la incidencia tomen proporciones muy elevadas cuando se amplíen los grupos y el tiempo de seguimiento. En el estudio de la Clínica Mayo¹³ se objetivaron claras ventajas con significación estadística en el estadio tumoral ($p = 0,0019$) y en la tasa de mortalidad al cabo de 9 años ($p = 0,0016$), siendo la supervivencia actuarial del 33% en el grupo de estudio frente al 15% en el grupo control. En el conocido como «estudio checoslovaco»¹², tanto la distribución por estadios como la supervivencia a cinco años fueron significativamente mejores en el grupo analizado. En el proyecto del Memorial-Sloan Kettering y de la Johns Hopkins University, también mejoraron la supervivencia actuarial y los estadios tumorales en relación con la predicción dependiente de las estadísticas¹⁵ en ambos grupos, experimental y de control.

Las posibilidades de desarrollar técnicas fiables de diagnóstico precoz son cada vez mayores en virtud de los conocimientos acumulados en la última década, muy especialmente en lo que se refiere a estudios citológicos con determinación de alteraciones genéticas.

Correspondencia: Dr. L. Callol Sánchez.
Servicio de Neumología. Hospital Universitario del Aire.
Arturo Soria, 82. 28017 Madrid.

Recibido: 23-2-99; aceptado para su publicación: 6-4-99.

(Arch Bronconeumol 1999; 35: 395-403)

Genética y cáncer de pulmón

La idea de campo de cancerización descrita por Slaughter et al⁶ hace cuarenta años, definida como el ataque difuso a un órgano resultado de la exposición a largo plazo de un agente carcinógeno, en la actualidad puede objetivarse desde un punto de vista molecular y celular. En el pulmón, la exposición al humo del tabaco, al radón o a otros carcinógenos, desencadena múltiples focos de lesiones precancerosas. Debe existir una base genética, presumiblemente importante, que justifique la aparición de cáncer sólo en un 10-20% de los fumadores, produciendo déficit enzimáticos en sistemas que afectan a la activación carcinogénica (P450 isoenzimas CYP1A1 y CYP2D6)^{17,18} y a la destoxicación carcinogénica (glutatión S-transferasa)^{17,18}. Los procesos de la carcinogénesis son muy complejos, incluyendo un factor de susceptibilidad, tal como indica la mayor incidencia de cáncer en pacientes con EPOC, los cuales desarrollan, además de una hiperplasia epitelial y una fibrosis subepitelial¹⁹, un incremento en el número de células neuroendocrinas²⁰ y en la producción de péptidos bombesina-like^{21,22}. La hipótesis de campo de cancerización viene avalada por el hallazgo de diferentes mutaciones en el gen *p53*, tanto en células tumorales como en células de tejido próximo aparentemente normal²³. También en el mismo gen *p53* o en el *K-ras* o por la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 3p en múltiples lesiones cancerosas o precancerosas pulmonares o, a su vez, por el hallazgo de múltiples lesiones en el mismo paciente de origen independiente, según demuestran estudios moleculares²⁴.

Las mutaciones genéticas en las células ocurren en condiciones normales con baja frecuencia, aproximadamente 10^{-5} - 10^{-7} veces por cada gen y por cada generación, siendo 10^{14} el número de células de un organismo normal^{25,26}. El papel de los oncogenes en la patogenia del cáncer de pulmón abre nuevas posibilidades al diagnóstico precoz. Se necesitan múltiples lesiones genéticas para alcanzar la transformación neoplásica, por lo que es presumible hallar algunas de ellas en la patocronia de la enfermedad tumoral mucho antes de desarrollarse una neoplasia, lo que permitiría alertar sobre el riesgo de padecimiento, aconsejando medidas de prevención o aplicando tratamientos de modo precoz^{27,28}.

Tres grupos de genes se han identificado por sufrir frecuentemente modificaciones en el cáncer: protooncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores del ADN. Los protooncogenes son genes normales que llegan a ser oncogenes cuando sufren una mutación. Son genéticamente dominantes, de modo que la variación de un solo alelo es capaz de desarrollar la alteración reproductora celular²⁷⁻²⁹. Los genes supresores de tumor inhiben, en condiciones normales, la división celular en respuesta a un daño del ADN. Para su alteración efectiva necesitan la mutación de los dos alelos, pasando de ser heterocigotos a ser homocigotos inactivos, lo que se denomina "pérdida de heterocigosidad"^{26,27,30-32}, actuando en condiciones normales como inhibidores de la proliferación celular^{27,33}. El tercer grupo, mutación de genes reparadores del ADN, también se produce con carácter recesivo, siendo necesaria la pér-

didada de heterocigosidad para que inhiban la reparación del ADN²⁵.

Se han buscado mutaciones específicas en el cáncer de pulmón. La expresión inducida de oncogenes de la familia *ras* (*N-ras*, *H-ras* y, sobre todo, *K-ras*) se consideró la más representativa en el cáncer broncogénico, relacionándose de preferencia con el adenocarcinoma. La mutación *K-ras* favorece una menor diferenciación histológica del tumor³⁴. Los oncogenes de la familia *erb-B* parecen tener interés igualmente en el desarrollo del cáncer de pulmón. Esta familia está compuesta por el *C-erb-1*, que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), y el *C-erb-2* o *HEG-2/neu*, codificador de una glucoproteína transmembrana (p185) de gran similitud con el RFCE^{27,31,35-36}. El RFCE se expresa sobre todo en los carcinomas no microcíticos (NICP), de preferencia en los epidermoides^{27,31,37}, y la proteína p185, además de expresarse en el epitelio respiratorio ciliado, neumocitos II y glándulas de la mucosa, lo hace en el adenocarcinoma^{27,35,37,38}. El *Bcl-2*, regulador negativo de apoptosis, se expresa de modo diverso en los NICP³⁹, y cuando esto tiene lugar mejora su pronóstico^{40,41}. Los oncogenes *NEU*^{40,41} y *MYC* son particularmente importantes en los tumores de célula pequeña (ICP)^{39,42,43}. Anormalidades del gen del retinoblastoma (RB), regulador del ciclo celular, se detectan en más del 90% del ICP, observándose una relación inversa entre la expresión de RB y la aparición de *p16INK4A*, regulador de RB³⁹. Más adelante se volverán a mencionar algunos de estos hallazgos, en relación a los cromosomas afectados.

Muchas de estas mutaciones no son viables, por lo que no representan riesgos patológicos. En otras ocasiones, aunque sí lo sean, no son capaces de desarrollarse al quedar anuladas por mecanismos de defensa, por ejemplo la apoptosis. Se necesitan seis o siete mutaciones genéticas distintas para que una célula normal sortee el mecanismo de control orgánico y dé lugar a una célula cancerosa. Si las mutaciones tienen lugar a un ritmo habitual, la probabilidad de que una misma célula sufra seis mutaciones debería ser de $1/10^{22}$, lo que es despreciable^{25,26}. Sin embargo, en algunas situaciones se producen incrementos en el riesgo de acumular mutaciones. Tal sucede cuando la proliferación celular es suficiente como para crear una gran población diana con alguna mutación, incrementando su frecuencia al alterar la estabilidad del cromosoma entero²⁵.

Knudson et al⁴⁴ han descrito hipotéticamente cuatro grupos demográficos con diferente expectativa de sufrir un cáncer, dependiendo de variables ambientales y hereditarias. El primer grupo comprendería el 20% de los cánceres y se limitaría a las mutaciones espontáneas. El segundo agruparía los cánceres secundarios a una clara alteración ambiental, como serían los dependientes de productos químicos. El tercer grupo, un tanto solapado con el segundo, reuniría a los individuos con alguna alteración genética que aumentara el riesgo de cáncer. Finalmente, en un cuarto grupo existiría una mutación hereditaria que disminuiría los escalones de la oncogénesis, como por ejemplo el cáncer de colon asociado a la poliposis colónica, el retinoblastoma o la neoplasia

endocrina múltiple tipo 2. En el cáncer de pulmón no ha podido demostrarse todavía una mutación hereditaria, y muchos casos podrían incluirse dentro del grupo 2 de Knudson et al⁴⁴.

En los últimos 15 años con técnicas de microdissección y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha procesado una gran cantidad de muestras de lesiones preneoplásicas y tumorales accesibles a estudios genéticos⁴⁵. La PCR permite amplificar de modo rápido y selectivo secuencias dentro de una heterogénea colección de ADN. Las regiones diana del ADN obtenidas de lesiones sospechosas pueden compararse con las equivalentes obtenidas de leucocitos en sangre periférica y detectar cualquier pérdida de heterocigosidad²⁵. Se han comparado los resultados obtenidos buscando displasias en muestras de vías aéreas normales de fumadores activos, no fumadores y ex fumadores^{47,48}, y similares determinaciones en especímenes de tumor, mucosa displásica adyacente y mucosa distal. Las muestras fueron tomadas al mismo tiempo en un estudio transversal, en diferentes momentos, para llevar a cabo un estudio longitudinal. Se objetivó una relación clonal, es decir, derivada de la misma célula, en las muestras tomadas de anomalías bronquiales adyacentes en el mismo paciente, pero no ha sido posible establecerla entre lesiones distantes^{49,50}. Este hallazgo sugiere que el estudio de las muestras obtenidas de diferentes lesiones adyacentes al tumor es una alternativa legítima para estudiar la progresión tumoral.

El cáncer de pulmón tiene múltiples cariotipos, aunque casi no han podido demostrarse anomalías en él. Deleción o pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 3 es la mutación más frecuentemente encontrada, tanto en los tumores de célula pequeña (ICP) como en los de célula no pequeña (NICP)^{51,50}. Probablemente la mutación sencilla más común a todos los cánceres humanos es la del gen *p53* en 17p13, presente en la mayoría de los ICP (80%) y en menor porcentaje en los NICP (50%), que provoca la pérdida de la función supresora tumoral, inhibiendo la apoptosis y favoreciendo la proliferación celular^{39,52,53}. Una deleción de *9p* se observa en las más frecuentes lesiones precancerosas, tanto en los NICP como en los ICP^{54,55}. El gen *p16* y el *p21*, originalmente descritos como genes supresores de tumor en la leucemia, se encuentran frecuentemente incluidos en la patogenia de los NICP y de los ICP, con algunos otros genes supresores de tumor, todavía no identificados, más frecuentemente englobados en el último.

Se han demostrado deleciones del brazo largo del cromosoma 13 en la región del retinoblastoma en ICP^{34,56}. Importantes oncogenes asociados con la evolución del cáncer de pulmón incluyen el *K-ras*, que determina una menor diferenciación celular tal como se ha citado anteriormente³⁴, el *Bcl-2*, un regulador negativo de apoptosis, que se expresa de modo diverso en los NICP³⁹ y que mejora el pronóstico de estos tumores^{40,41}, el oncogén *NEU*^{40,41} y el *MYC*, particularmente importante en los ICP^{39,42,43}. El receptor de factor de crecimiento *C-erb-2* está sobreexpresado en más del 25% de los NICP³⁹.

En estudios con PCR en biopsias bronquiales de fumadores activos, antiguos fumadores y no fumadores no se encontró diferencia significativa en la frecuencia de pérdida de heterocigosidad entre los fumadores activos y los antiguos fumadores, con mutaciones múltiples que seguían siendo demostrables 48 años después de cesar el consumo de tabaco. No se hallaron mutaciones en no fumadores⁴⁷. Mao et al⁴⁸ observaron pérdida de la heterocigosidad en el 82% de los fumadores activos frente a un 62% en los ex fumadores y menos del 10% en las personas que nunca habían fumado. La pérdida de la heterocigosidad ocurría en tres lugares específicos, cromosomas 3p14, 9p21 y 17p13, siendo menos frecuente en 3p14 en los ex fumadores recientes, lo que indica que la mutación en este punto es un buen marcador del consumo de tabaco. La persistencia de las mutaciones en antiguos fumadores proporciona una explicación biológica a la observación de que el riesgo de padecer un cáncer de pulmón nunca retorna completamente a los valores iniciales de los no fumadores^{57,58}.

Los procedimientos para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón pueden dividirse en procesamiento del esputo, técnicas de imagen, fotodinamia endoscópica y una miscelánea, dentro de la cual estarían los marcadores biológicos del empleo habitual en el suero y en el lavado broncoalveolar.

Utilidad del esputo

El estudio citológico del esputo para el diagnóstico del cáncer broncogénico está en duda como método de *screening*, al menos en lo que se refiere a la citología convencional. No ha mejorado el rendimiento de la radiografía de tórax⁵⁹. Sin embargo, dadas las características de crecimiento del cáncer broncogénico hacia la luz, bien sea al interior de la vía aérea de conducción o bien hacia la luz del alveólo, el esputo parece ser una muestra representativa por encima de los marcadores en el suero, que necesitarían un crecimiento tumoral superior a 10⁹ células⁶⁰, que fuera capaz de afectar a los vasos para permitir el paso de sustancias a la sangre.

No son raras las diferencias entre profesionales a la hora de evaluar una muestra de esputo, que alcanza hasta un 23% de variabilidad, con frecuentes falsos positivos y falsos negativos⁶¹. Ha de tenerse en cuenta que un esputo positivo no significa forzosamente un estadio precoz del cáncer broncogénico, incluso si éste no es visible en la radiografía, oscilando en este caso la frecuencia de un tumor no invasivo entre el 13 y el 34%^{62,63}. En el cáncer broncogénico epidermoide es frecuente el hallazgo de una citología positiva en pacientes con radiografía de tórax normal y poca afectación linfática mediastínica⁶⁴. Entre los años 1959 y 1961, Koss y Cahan⁶⁵ realizaron un estudio citológico sistemático del esputo en una población de riesgo (fumadores de más de 40 años), descubriendo 2 casos positivos de 643 estudiados. Bocking et al⁶⁶, sobre un total de 4.297 muestras de esputo incluidos en parafina, con análisis de cortes seriados y utilizando tinción de hematoxilina eosina, correspondientes a 1.889 pacientes, de los cuales 219 tenían un cáncer broncogénico, alcanzaron una sensibilidad de un 84,5%. Este ha-

llazgo estaba muy influenciado por la cantidad de muestras estudiadas por cada paciente, siendo la media de 3 esputos, pero no por el TNM ni por el tipo histológico. La especificidad del método alcanzó el 99,5%. En tres casos se diagnosticaron carcinomas ocultos, dos de ellos localizados con seguimiento, falleciendo el tercero sin comprobación. Los resultados obtenidos obligaron a los autores a replantearse seriamente el papel de la citología de esputo. Esta técnica parece muy válida para el diagnóstico precoz del cáncer broncogénico. Los autores criticaron la metodología y los resultados de otros grupos⁶⁶.

Reestudiando el banco de esputos de la John Hopkins University de pacientes a los que se había hecho un seguimiento a largo plazo, se procedió a un análisis sistemático de dos anticuerpos monoclonales, uno capaz de reconocer la fucosa interna del carbohidrato difucosyl-neolactonorhexaosylceramida, que se conoce como Lewis X difucosilado, y otro reconocedor de una proteína de 31 kd. Usando una cohorte de material obtenido 20 meses antes de la detección clínica del cáncer y comparándola con casos negativos para tumor, el análisis demostró una sensibilidad de un 91% y una especificidad del 88%, con una significación estadística muy elevada ($p < 0,000001$). Aplicando el mismo procedimiento a otro grupo en el cual las muestras correspondían a 40 meses antes del diagnóstico clínico del cáncer de pulmón, el análisis de los dos anticuerpos alcanzó una sensibilidad del 64% y una especificidad del 88%⁶⁷.

Las técnicas de fluorescencia de hibridación *in situ* para el cromosoma 7 y de inmunocitoquímica para citoqueratina permiten la visualización de aberraciones cromosómicas en las células epiteliales del bronquio en muestras de esputo, apareciendo fluorescencia roja para el cromosoma 7, contrastando los núcleos en azul y visualizándose la citoqueratina en verde. Los procedimientos citados podrían poner de manifiesto otras moléculas citogenéticas y marcadores inmunológicos presentes en las células malignas del esputo como, por ejemplo, pérdida de regiones cromosómicas 9p21, 3p14, 21 y 25. Además, el uso de triple paso de banda por filtros probablemente aumenta la sensibilidad y la especificidad de la citología del esputo, siendo muy útil para la detección precoz de cáncer broncogénico^{6,68}.

Existen publicaciones que sugieren su posible aplicación clínica⁶⁹. Mao et al⁷⁰, en 1994, estudiaron esputos almacenados de quince pacientes que posteriormente sufrieron un adenocarcinoma broncogénico. En 10 piezas tumorales se encontraron mutaciones de los genes *ras* o *p53* y en 8 de estos casos se identificaron mutaciones iguales en las células de esputos obtenidos, algunos de ellos, más de un año antes del diagnóstico del carcinoma. En siete de 11 pacientes con neumoconiosis, que posteriormente desarrollaron un carcinoma broncogénico, se hallaron cifras elevadas del fragmento extracelular de la proteína p185, y en cuatro de ellos este hallazgo precedió al diagnóstico una media de 35 meses⁷¹. En un paciente sin tumor aparente, pero que falleció seis meses después de cáncer de pulmón, se detectaron en suero anticuerpos anti-p53⁷². La positividad de *p53* por inmunohistoquímica en zonas bronquiales con metaplasia supone un valor predictivo positivo de tumor de

un 91%⁷³. Igualmente, se han detectado valores elevados de TNF-alfa en pacientes diagnosticados de asbestosis que sufrieron un cáncer de pulmón.

Schenk et al⁷⁴ hallaron alteraciones cromosómicas con técnica de interfase de fluorescencia en hibridación *in situ* en 20 muestras celulares pertenecientes a 10 tumores primarios pulmonares y a 10 derrames malignos (derrame pleural, ascitis, líquido pericárdico). Usando la aneuploidía como marcador, se examinó material obtenido por broncoscopia de 10 pacientes con cáncer broncogénico, evidenciándose en todos ellos existencia de malignidad con la técnica de fluorescencia e hibridación *in situ*. En tres de estas muestras, las células parecían normales o con alteraciones reactivas por criterios citológicos convencionales⁷⁴⁻⁷⁶.

Métodos de imagen

Aunque la radiografía convencional de tórax se ha utilizado ampliamente en el *screening* del cáncer de pulmón, sus resultados en pequeños nódulos periféricos no son buenos^{12,15,77-83}, y todavía no hay un consenso sobre su empleo sistemático con este fin. Aunque uno puede preguntarse para qué gastar tanto esfuerzo y dinero en una enfermedad que podría ser prevenida casi en su totalidad, la realidad es que existen grandes problemas políticosociales para conseguir este objetivo de modo prioritario.

El diagnóstico tumoral del nódulo pulmonar solitario (NPS) va siendo cada vez más frecuente y, en la clínica diaria, se abre paso la utilidad de la radiología. Antes de 1980, la American Cancer Society recomendó realizar una radiografía convencional de tórax a los grandes fumadores y a los trabajadores del asbesto⁸⁴ y, aunque posteriormente cambió su política, siguiendo las recomendaciones del National Cancer Institute's Early Lung Cancer Trial, un 40% de los médicos americanos incluían la radiografía de tórax como seguimiento de los pacientes asintomáticos en 1989⁸⁵.

En un estudio de 40 NPS detectados de modo correlativo, realizado por Libby et al⁸⁶, en pacientes con una media de edad de 65 años, resultaron ser malignos un 53% de ellos con un diámetro medio de 1,8 cm, el 43% de los menores de 2 cm y el 80% de los mayores de 2 cm. Es muy importante destacar que el 94% de ellos se hallaban en estadios quirúrgicos (I, II y IIIA). El 40% de los pacientes tumorales incluidos en este estudio presentaban antecedentes familiares del cáncer broncogénico. Si con un *screening* se consiguiera una modesta reducción de la mortalidad de sólo un 10%, en los EE.UU. se salvarían unas 14.000 vidas cada año⁸⁷.

En 1993, Smart⁸⁷ cita un protocolo desarrollado en Japón por Soda et al, realizando una radiografía de tórax anual a 305.934 personas asintomáticas mayores de 40 años, sin distinción de sexo o hábitos tabáquicos. La sensibilidad de la radiografía de tórax alcanzó un 70% de los tumores, el 50% de los cuales se detectaron en estadio I, cuando sólo el 12% de los cánceres que se iniciaron clínicamente en el intervalo del estudio pertenecían al estadio I. La sensibilidad fue muy superior para los adenocarcinomas (82%) y menor para los epider-

moides y de células pequeñas (aproximadamente un 50%). Los adenocarcinomas pudieron ser identificados en radiografías previas hechas antes de su diagnóstico en mayor número que las otras estirpes, lo que sugiere un crecimiento más lento en su evolución. Este estudio ha de considerarse de notable interés como inicio de posteriores trabajos de detección precoz.

Smart⁸⁷ estudio los factores a favor y en contra de los resultados obtenidos con los estudios prospectivos de diagnóstico precoz. Es posible que las pruebas no consiguieran detectar la neoplasia con suficiente antelación. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que, por causas estadísticas, se incluyeron en los trabajos, por una parte, los casos a los que se ofreció el estudio y no fue aceptado y, por otra, aquellos del grupo control que se sometieron a estudio por un tumor diferente, lo que facilitó el diagnóstico precoz de un cáncer de pulmón al cual sobrevivieron. Estos datos acercaron el resultado de este grupo al obtenido en el estudio, todo lo cual falseó negativamente los resultados. Por otra parte, el seguimiento debe mantenerse durante 10-20 años en el caso de que se considere la mortalidad como único dato de valor⁸⁷.

Algunas de las causas citadas pudieron interferir las conclusiones de los estudios iniciales llevados a cabo por la Clínica Mayo, la John Hopkins University y el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, en los cuales pareció demostrarse que la realización sistemática de una radiografía anual no aportaba nada a la citología cuatrimestral en una población de riesgo. No se tuvo en cuenta que en el grupo de la Clínica Mayo, que llegaba a esta conclusión, los médicos de cabecera realizaban radiografía de tórax y citología periódica a sus pacientes, los cuales fueron incluidos en el grupo control, hasta el punto de que a la mitad de los pacientes de este grupo se le había realizado una radiografía de tórax anual, siendo diagnosticados por otro método distinto al radiológico sólo un 30% de los casos⁸⁸. Este nivel de contaminación redujo la capacidad de detectar diferencias entre el grupo control y el de estudio aproximadamente en un 50%⁸⁷. Los resultados demostraron una supervivencia a 5 años de los pacientes diagnosticados en el grupo de estudio de un 35%, y de un 25% en el grupo control, mientras que en la población general, utilizando métodos convencionales, las más de las veces clínicos, sólo era de un 10%. Existía pues una evidencia de que las técnicas de *screening* con radiografía y citología adelantaban el momento del diagnóstico, que permitía así un tratamiento más efectivo. La supervivencia a 10 años de seguimiento tras el diagnóstico se daba en un 50% de los pacientes diagnosticados con *screening* citológico, en el 35% de los diagnosticados con radiología y sólo en el 10% de los sintomáticos⁸⁹. Otras estimaciones de los beneficios obtenidos en los grupos de estudio y control en relación con los sintomáticos, utilizando los datos de la John Hopkins University del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, referidos al tiempo de antelación diagnóstica en relación al tipo histológico y a la supervivencia desde el momento del diagnóstico, llegaron a la conclusión de que tenía lugar un 20% de reducción para los cánceres detectados en el *screening*. Por otra parte, Flehinger et al⁹⁰, en modelos cinéticos de

cáncer de pulmón, concluyeron que la reducción de la mortalidad para los adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de células grandes no era superior al 18% en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center y al 5% en la John Hopkins University.

La utilización de la TC helicoidal de baja radiación con aparatos móviles desplazados en autocares apropiados, está ofreciendo resultados interesantes. Sone et al⁹¹, en 5.483 personas pertenecientes a una población general no seleccionada, a las que realizaron una citología de esputo, una TC espiral a baja dosis y, además, una fluorofotografía en miniatura en 3.967 de ellos, demostraron que la TC de baja dosis de radiación presenta una sensibilidad muy superior a las técnicas habituales utilizadas (0,48 frente a 0,03-0,05%), lo que abre una nueva vía de gran importancia en el diagnóstico precoz.

Fotodinamia

Las técnicas endoscópicas basadas en la visualización de áreas potencialmente malignas por la fluorescencia tras iluminación con diversas fuentes de radiación lumínica (fotodinamia) hace muchos años que se iniciaron con carácter experimental. Se desarrollaron en el Tokyo Medical College y en la Universidad de California⁹²⁻⁹⁴, utilizando láser de argón o de criptón, y en la Clínica Mayo⁹⁵, analizando la fluorescencia mediante una lámpara de mercurio que, activando un sistema productor de sonido, avisaba cuando aquélla era propia de un tejido anormal^{95,96}. Estos métodos necesitaban sensibilización previa de las células con derivados de hematoporfirina (dihidrohematoporfirina [DHE]), lo que desencadenaba importantes problemas de fotosensibilización a la luz solar.

En la actualidad se utiliza la autofluorescencia^{97,98}, capacidad de las células de emitir espontáneamente luz de diferentes longitudes de onda al ser estimuladas por la exposición a una fuente de láser determinada, diferenciando entre células benignas y malignas. Este sistema conocido como LIFE (*lung imaging fluorescence endoscope*), emplea para la iluminación láser de heliocadmio (He-Cd), de una longitud de onda de 442 nm, que es proyectada sobre el tejido bronquial a través del haz de iluminación del broncofibroscopio, alcanzando una potencia en el extremo distal del mismo de 12-15 mw. Se induce así en el tejido normal la producción de un pico de fluorescencia a 520 nm (verde) y un pico de menor cuantía, alrededor de 630 nm (rojizo). Cuando se está ante un carcinoma *in situ* o ante una displasia, tiene lugar una reducción de la fluorescencia en unas 10 veces y un cambio en la proporción de luz verde/luz roja. Esta emisión de luz producida por la autofluorescencia es captada por una cámara que digitaliza la señal y muestra una imagen en monitor en tiempo real. La mucosa normal adquiere un color verde, mientras que las áreas patológicas aparecen como parches amarronados^{46,98-100}. No se necesita ninguna preparación especial para emplear este sistema.

Lam et al¹⁰¹ compararon la rentabilidad diagnóstica de biopsias realizadas en broncofibroscopias con aplicación de láser de He-Cd con las realizadas con visión

proporcionada por fuente convencional de luz blanca. Utilizando el sistema LIFE, en 53 pacientes con diagnóstico conocido o con sospecha de cáncer de pulmón, fueron detectadas una o más áreas de carcinoma *in situ* añadidas a una clara invasión tumoral en el 15% de ellos, moderada displasia en el 8% y severa displasia en el 6%. Entre 17 voluntarios fumadores sin sospecha de padecer cáncer de pulmón, el 48% tenían moderada displasia y el 12% severa displasia. En 16 ex fumadores, el 25% presentaban moderada displasia, el 6% severa displasia y un 13% carcinoma *in situ*. La sensibilidad de la broncoscopia con fuente de luz blanca en la detección de la displasia moderada/severa y del carcinoma *in situ* fue del 48,4%, con una especificidad del 94%. Usando el sistema LIFE, la sensibilidad aumentó un 50%, y alcanzó el 72,5% manteniendo la misma especificidad. En otro trabajo, desarrollado por la British Columbia Cancer Research Center y llevado a cabo por el mismo grupo, ampliando el número de voluntarios sanos, se obtuvieron los mismos resultados⁴⁶.

En el Tokyo Medical University Hospital, en 111 casos estudiados entre junio de 1997 y abril de 1998, se realizó una broncofibroscopia convencional seguida de una exploración con sistema LIFE, tomándose muestras de 213 localizaciones diferentes. Para el diagnóstico de displasia, los resultados obtenidos con el sistema LIFE y con broncofibroscopia convencional fueron: sensibilidad 93 frente a 51%, especificidad 65 frente a 59%, y valor predictivo positivo 76 frente a 66%, respectivamente para cada una de las técnicas¹⁰². Recientemente, Díaz Jiménez et al⁹⁸ han publicado el primer caso de detección de un carcinoma escamoso oculto mediante sistema LIFE realizado en España.

No obstante, otras publicaciones han destacado algunos aspectos menos positivos. Venmans et al¹⁰³ estudiaron los resultados de la fotodinamia diagnóstica en una población de 33 pacientes con sospecha de cáncer, en fase de estadificación de un cáncer de reciente diagnóstico o en seguimiento de cáncer de pulmón, cabeza o cuello. Aplicaron en ellos una técnica endoscópica convencional y el sistema LIFE, realizando biopsias en las zonas sospechosas y en zonas aparentemente normales y distantes de aquéllas. Uniendo los diagnósticos de displasia moderada o grave y de carcinoma *in situ*, comparando el sistema LIFE con el estudio convencional, consiguieron una sensibilidad del 89 y del 78%, una especificidad del 61 y del 88%, un valor predictivo positivo del 14 y del 32%, y un valor predictivo negativo del 99 y del 98%, respectivamente. Concluyeron que el sistema LIFE es algo más sensible que la broncofibroscopia convencional en este grupo seleccionado, pero a costa de una menor especificidad.

La aplicación del ácido gammaaminolevulínico (ALA) como fotosensibilizador previo a la iluminación con láser de He-Cd aporta poco al diagnóstico debido a su baja especificidad¹⁰⁴.

La fotodinamia supone un avance, pero todavía presenta problemas importantes. Dado que es imposible distinguir con metodología LIFE entre una displasia y un estadio temprano del carcinoma escamoso, con falsos positivos por alteraciones inflamatorias o secunda-

rios al sangrado, sigue siendo necesaria la confirmación histológica, lo que por otra parte es sencillo debido a estar marcada la zona sospechosa por el cambio de fluorescencia. Además, numerosas áreas tumorales resultan frías y, finalmente, existe un componente subjetivo importante en la valoración del cambio de color. En un futuro próximo a la cuantificación de la autofluorescencia podrá ser evaluada en tiempo real en el monitor¹⁰².

Otras muestras

Existen estudios que soportan la validez de los marcadores monoclonales utilizando muestras de suero en la detección del cáncer de pulmón. Aunque todavía se hallan en fase experimental, han demostrado un interés en la detección temprana de metástasis óseas¹⁰⁵.

Otros marcadores monoclonales han sido descritos como detectores precoces del cáncer de pulmón. Tal sucede con el 703D4, anticuerpo monoclonal de ratón cuya utilización es capaz de adelantarse en dos años a los hallazgos de la radiografía o de la citología convencional¹⁰⁶. Muchas sustancias bioquímicas (hormona adrenocorticotropa [ACTH], calcitonina, betagonadotropina coriónica humana, parathormona, antígeno carcinoembrionario [CEA], ferritina, ácido siálico, lipoproteína, beta-2-microglobulina) se han evaluado como marcadores séricos del cáncer de pulmón. Sin embargo, ninguna de ellas ha probado su eficacia para la detección precoz, ya que los valores requeridos para conseguir una elevada sensibilidad implican una baja especificidad y viceversa¹⁰⁷.

Marcadores clásicos (CEA, SCC, CA125, CYFRA 21.1) han demostrado una sensibilidad variable, entre el 60 y el 70%, en la detección temprana de las recidivas tumorales tras el tratamiento quirúrgico¹⁰⁸⁻¹¹⁰; alcanzan una especificidad en torno al 90%, anticipándose al diagnóstico por otros métodos en unos tres meses^{108,110}.

La validez de las muestras de lavado broncoalveolar está en fase experimental^{111,112}. Mills et al¹¹¹ han detectado mutaciones en el codón 12 del oncogén *K-ras* en un 56% de los casos de adenocarcinoma, en un 20% de carcinomas de células grandes y en ningún caso de carcinoma epidermoide, coincidiendo estos hallazgos con los encontrados en las muestras de tejido tumoral. En el mismo estudio, al no demostrarse la presencia de dicha mutación en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar no tumoral, se confirmó la alta especificidad de dicho hallazgo. Además, estos tumores han demostrado que, en el lavado broncoalveolar, la detección de mutaciones del oncogén *K-ras* posee mayor sensibilidad que el estudio citológico. Por ello, los citados autores proponen esta determinación como marcador de cáncer broncogénico y en especial en su detección precoz.

Conclusión

Ha de replantearse de nuevo el diseño de estudios prospectivos de diagnóstico precoz del cáncer de pulmón. Los nuevos análisis llevados a cabo sobre los tra-

bajos clásicos de la Clínica Mayo, el Sloan Kettering Cancer Center y la John Hopkins University demuestran que, aún existiendo errores en su interpretación, la utilidad de la citología convencional seriada es evidente en la detección de un número no despreciable de tumores en estadios precoces. Esto nos coloca en situación ideal para potenciar de nuevo el estudio del esputo como muestra de fácil y barata adquisición, sobre la cual desarrollar estudios genéticos capaces de detectar la expresión de oncogenes.

De modo semejante, el desarrollo de nuevas técnicas de imagen mucho más sensibles, como la aplicación de los nuevos métodos de TC helicoidal de bajo nivel de radiación, móviles y, por tanto, fácilmente asequibles a personas de riesgo, y la generalización de la fotodinamia endoscópica en grupos de muy alto riesgo o de sospecha, favorecen un cierto optimismo en un panorama que se ofrece sombrío al menos hasta la segunda década del próximo siglo. Y eso si se abandonara completamente el uso del tabaco.

BIBLIOGRAFÍA

- Spencer H. Carcinoma of the lung. En: Pathology of the lung (4.^a ed.). Londres: Pergamon Press, 1985; 773-859.
- Cancer Research Campaign. Lung cancer and smoking. Fact Sheet II. Cancer in the European Community. Fact Sheet V. Londres: Cancer Research Campaign, 1992.
- Parkin DM, Sasco AJ. Worldwide variation in occurrence and proporción atributable to tobacco use. *Lung Cancer* 1993; 9: 1-16.
- Fernández Fau L, Pun YW, Espinosa de los Monteros MJ, Prieto JA, Moreno Balsalobre R, Acevedo Barberá A. Cáncer de pulmón no células pequeñas. En: Caminero Luna JA, Fernández Fau L, editores Manual de neumología y cirugía torácica. Madrid: SEPAR, 1998; 1.511-1.536.
- Willcox PA, O'Brien JA, Abratt RP. Lung cancer at Groote Schuur Hospital: a local perspective. *S Afr Med J* 1990; 78: 6.176-6.720.
- American Thoracic Society. Future directions for research on diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 320-334.
- Nakhosteen JA, Khanavkar B, Muti A, Marek W: Früherkennung des Bronchialkarzinoms durch Autofluoreszenz (LIFE)-Bronchoskopie und automatisierte Sputum Zytometrie: Grund zur Hoffnung. *Atemweg-Lungenkrank* 1997; 23: 211-217.
- Castella J, Puzo C. Neoplasias broncopulmonares. En: Broncología. Barcelona: Ed. Salvat S.A., 1982; 131-155.
- Fontana RS, Sanderson DR, Miller WE, Woolner LB, Taylor WF, Uhlenhopp MA. The Mayo Lung Project. Preliminary report of "early cancer detection" phase. *Cancer* 1972; 30: 1.373-1.382.
- Weiss W, Seidman H, Boucot KR. The Philadelphia Pulmonary Neoplasm Research Project: thwarting factors in periodic screening for lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 289-294.
- Bechtell JJ, Kelley WR, Petty TL, Patz DS, Saccomanno G. Outcome of 51 patients with roentgenographically occult lung cancer detected by sputum cytologic testing: a community hospital program. *Arch Intern Med* 1994; 154: 975-980.
- Kubik A, Parkin DM, Klat M, Erban J, Polak J, Adamec M. Lack of benefit from semi-manual screening for cancer of the lung: follow-up report of a randomized controlled trial on a population of high-risk males in Czechoslovakia. *Int J Cancer* 1990; 45: 26-33.
- Fontana R, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR. Lung cancer screening: the Mayo program. *J Occup Med* 1986; 28: 746-750.
- Prorok PC, Hanley BF, Bundy BN. Concepts and problems in the evaluation of screening program. *J Chronic Dis* 1981; 34: 159-171.
- Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, Woolner LB, Miller WE, Muhm JR et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 561-565.
- Siegfried JM. Biology and chemoprevention of lung cancer. *Chest* 1998; 113: 40-45.
- Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 37-43.
- Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Antilla S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene* 1995; 159: 113-121.
- Aguayo SM. Determinants of susceptibility to cigarette smoke: potential roles for neuroendocrine cells and neuropeptides in airway inflammation, airway wall remodeling, and chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1.692-1.698.
- Gosney JR, Sissons M, Allibone R, Blakey AF. Pulmonary endocrine cells in bronchitis and emphysema. *J Pathol* 1989; 147: 127-133.
- Aguayo SM, Kane MA, King TE, Schwartz MI, Grauer L, Miller YE. Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers. *J Clin Invest* 1989; 84: 1.105-1.113.
- Aguayo SM, Miller YE, King TE. Idiopathic hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells. *N Engl J Med* 1993; 328: 581-582.
- Kanjilal S, Strom SS, Clayman GL, Webber RS, El-Naggar AK, Kapur V et al. P53 mutations in nonmelanoma skin cancer of the head and neck: molecular evidence for field cancerization. *Cancer Res* 1995; 55: 3.604-3.609.
- Sozzi G, Miozzo M, Pastorino U, Pilotti S, Donghi R, Giarola M et al. Genetic evidence for an independent origin of multiple preneoplastic and neoplastic lung lesions. *Cancer Res* 1995; 55: 135-140.
- Roland M, Rudd RM. Somatic mutations in the development of lung cancer. *Thorax* 1998; 53: 979-983.
- Strachan T, Read AP. Somatic mutations and cancer. En: Strachan T, Read AP, editores. Human molecular genetics. Oxford: Bios Scientific Press, 1996; 457-477.
- Hernández Hernández JR. Genética y cáncer de pulmón. En: Caminero LUna JA, Fernández Fau L, editores. Actualizaciones SEPAR. Barcelona-Filadelfia: Prous Science, 1996; 2: 71-96.
- Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 1993; 103 (Supl): 449-456.
- Krontiris TG. Molecular medicine. *Oncogenes*. *N Engl J Med* 1995; 333: 303-306.
- Mulshine JL, Trestron AM, Brown PH, Birrer MJ, Shaw GL. Initiators and promoters of lung cancer. *Chest* 1993; 103 (Supl): 4-11.
- Molina F, Monzo M, Rosell R. Oncogenes en cáncer de pulmón. *Rev Cancer* 1994; 8: 172-177.
- Carbone DP. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Hosp Prac* 1993; 6: 145-161.
- Benito M. Genes supresores. *Rev Cancer* 1995; 9: 110-114.
- Rodenhuis, Slebos RJC. Clinical significance of ras oncogenes activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52 (Supl): 2.665-2.669.
- Cagle PT. Molecular pathology of lung cancer and its clinical relevance. *Monogr Pathol* 1993; 36: 134-144.
- Johnson BE. Biologic and molecular prognostic factors. Impact on treatment of patients with non small cell lung cancer. *Chest* 1995; 107 (Supl): 287-290.
- Anderson MLM, Spandidos DA. Oncogenes and onco-suppressor genes in lung cancer. *Respir Med* 1993; 87: 413-420.
- Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu D, Hung MC. Overexpression of the c-erbB2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinogen* 1992; 5: 213-218.
- Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1.207-1.217.
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunhill MS, Pierce B et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-694.
- Waker C, Robretson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1995; 72: 164-169.
- Nau M, Brooks B, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch AR et al. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 1985; 318: 69-73.

43. Wong A, Rupper J, Eggleston J, Hamilton SR, Baylin SB, Vogelstein B. Gene amplification of C-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 1986; 233: 461-465.
44. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1.437-1.443.
45. Strachan T, Read AP. PCR-based DNA cloning and DNA analyses. En: Strachan T, Read AP, editores. *Human molecular genetics*. Oxford: Bios Scientific Press, 1996; 129-145.
46. Lam S, MacAulay C, Hung J, Leriche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 1.035-1.040.
47. Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, Lerich J et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1.366-1.373.
48. Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 857-862.
49. Chung GTY, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbitts PH et al. Clonal evaluation of lung tumors. *Cancer Res* 1996; 56: 1.609-1.614.
50. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD et al. Allele specific chromosome 3p deletions occur an early stage in lung cancer. *JAMA* 1995; 273: 558-563.
51. Rabbitts PH. Genetic changes in the development of lung cancer. *Br Med Bull* 1994; 50: 688-697.
52. Takahashi T, Takahashi H, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y et al. The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 1991; 6: 1.775-1.778.
53. Chica I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990; 5: 1.603-1.610.
54. Sidransky D. Importance of chromosome 9p loss in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1.201-1.202.
55. Kishimoto Y, Sugio K, Hung J, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD et al. Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1.224-1.229.
56. Yokota J, Akiyama T, Fung Y, Benedict WF, Namba Y, Hanakawa M et al. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988; 3: 471-475.
57. Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years observation in male British doctors. *Br Med J* 1976; 2: 1.525-1.536.
58. Halpern MT, Gillespie BW, Warner KE. Patterns of absolute risk of lung cancer mortality in former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 457-464.
59. George PJM. Delays in the management of lung cancer. *Thorax* 1997; 52: 107-108.
60. Mulshine JL, Scott F. Molecular markers in early cancer detection. New screening tools. *Chest* 1995; 107: 280-286.
61. Evans DMD, Shelley G. Respiratory cytodiagnosis: study in observer variation and its relation to quality of material. *Thorax* 1982; 37: 259-263.
62. Tao L. Cytologic diagnosis of radiographically occult squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1982; 50: 1.580-1.586.
63. Woolner LB, Fontana RS, Cortese DA, Sanderson DR, Bernatz PE, Payne WS et al. Roentgenographically occult lung cancer: pathologic findings and frequency of multicentricity during a 10 year period. *Mayo Clin Proc* 1984; 59: 453-466.
64. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, Woolner LB, Miller WE, Muhm JR et al. Early lung cancer detection: summary and conclusions. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130: 565-570.
65. Koss LE. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*. Philadelphia: JB Lippincott, 1979.
66. Bocking A, Biesterfeld S, Chatelain R, Gien-Gerlach G, Esser E. Diagnosis of bronchial carcinoma on sections of paraffin-embedded sputum. Sensitivity and specificity of an alternative to routine cytology. *Acta Cytol* 1992; 36: 37-47.
67. Tockmam MS, Gupta PK, Myers JD. Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen detection. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1.685-1.693.
68. Neft RE, Murphy MM, Tierney LA, Belinsky SA, Anderson M, Saccomanno G et al. Concurrent fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry for the detection of chromosome aberrations in exfoliated bronchial epithelial cells. *Acta Cytol* 1997; 41: 1.769-1.773.
69. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Trédaniel J, Legros Y, Cazals D et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancers. *Nat Med* 1995; 1: 701-702.
70. 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: 1.634-1.637.
71. Brandt-Rauf PW, Luo JC, Carne WP, Smith S, De Vivo I, Milling Hemminki K et al. Detection of increased amounts of the extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein in serum during pulmonary carcinogenesis in humans. *Int J Cancer* 1994; 56: 383-386.
72. Schlichtholz B, Trédaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsch A, Soussi T. Analysis of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in p53 protein. *Br J Cancer* 1994; 69: 808-816.
73. Boers JE, Ten Velde GPM, Thunnissen BJM. P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 411-416.
74. Schenk T, Ackermann J, Brunner C, Schenk P, Zojer N, Roka S et al. Detection of chromosomal aneuploidy by interphase fluorescence *in situ* hybridization in bronchoscopically gained cells from lung cancer patients. *Chest* 1997; 111: 1.691-1.696.
75. Heyne KH, Lippman SM, Lee JJ, Lee JS, Hong WK. The incidence of second primary tumors in long-term survivors of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1.519-1.524.
76. Sagman U, Lisner M, Maki E, Shepherd FA, Haddad R, Evans WK et al. Second primary malignancies following diagnosis of small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1.525-1.533.
77. Melamed M, Flehinger B, Miller D, Osborne R, Zaman M, McGinnis C et al. Preliminary report of the lung cancer detection program in New York. *Cancer* 1977; 39: 369-382.
78. Melamed MR, Flhinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, Perchik WA, Martini N. Screening for early lung cancer: results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest* 1984, 86: 44-53.
79. Berlin NI, Buncher C, Fontana RS, Frost JK, Melamed MR. The National Cancer Institute cooperative early and detection program: results of the initial screen (prevalence). *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 545-549.
80. Frost JK, Ball WC Jr, Levin M, Tockman MS, Baker RR, Carter D et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 549-554.
81. Ebeling K, Nischam P. Screening for the lung cancer: results from a case-control study. *Int J Cancer* 1987; 40: 141-144.
82. Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR et al. Screening for lung cancer: a critique of the Mayo lung project. *Cancer* 1991; 67: 1.155-1.164.
83. Sobue T, Suzuki, Naruke T. The Japanese Lung-Cancer-Screening Research Group. A case-control study for evaluating lung-cancer screening in Japan. *Int J Cancer* 1992; 50: 230-237.
84. Eddy D. ACS report on the cancer-related. Health check-up. *CA Cancer J Clin* 1980; 30: 193-240.
85. American Cancer Society. 1989 survey of physician's attitudes and practices in early cancer detection. *CA Cancer J Clin* 1990; 40: 77-101.
86. Libby DM, Henschke CI, Yankelevitz DF. The solitary pulmonary nodule: update 1995. *Am J Med* 1995, 99: 491-496.
87. Smart CR. Annual Screening Using Chest X-ray Examination for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancer* 1993; 72: 2.295-2.298.
88. Fontana RS. Screening for lung cancer. En: Miller AB, editor. *Screening for cancer*. Nueva York: Academic Press, 1985; 377-395.
89. Chu KC. Technical report on the early cancer trial, early detection branch, division of cancer prevention and control. National Cancer Institute. Bethesda: National Institute of Health, 1991.
90. Flehinger BJ, Kimmel M, Melamed MR. Natural history of adenocarcinoma-large cell carcinoma of the lung: conclusions from screening programs in New York and Baltimore. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 337-344.
91. Sone S, Takashima S, Li F, Yang Z, Honda T, Maruyama Y et al. Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography cancer. *Lancet* 1998; 351: 1.242-1.245.
92. Díaz Jiménez JP, Martínez Ballarín JI. Fotoquimioterapia. Utilidad de la hematoporfirina y el láser en el tratamiento fotorradioterápico del cáncer. En: Díaz Jiménez JP, editor. *Láser en medicina y cirugía*. Barcelona: Ars Libris, 1993; 29-33.

93. Hirano T, Ishizuka M, Suzuki K, Ighida K, Suzuki S, Miyaki S et al. Photodynamic cancer diagnosis and treatment system consisting of pulse lasers and endoscopy spectro image analyzer. *Lasers Life Sci* 1989; 3: 1-18.
94. Profio AE, Doiron DR. A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for localization of small lung tumors. *Phys Med Biol* 1977; 22: 949-957.
95. Kato H, Cortese DA. Early detection of lung cancer by means of hematoporphyrin derivative fluorescence and laser photoradiation. *Clin Chest Med* 1985; 6: 237-253.
96. Reid PT, Rudd RM. Diagnostic investigations in lung cancer. *Eur Respir Monogr* 1995; 1: 188-211.
97. Vermylen P, Berghmans T, Roufosse C, Pierard P, Ninane V, Sculier JP. Diagnosis and treatment of early-stage bronchial cancer: current status. *Rev Med Brux* 1997; 18: 347-352.
98. Díaz-Jiménez JP, Sans Torres J, Domingo C, Martínez-Ballarín I, Catro MJ, Manresa F. Primer caso en España de detección de un carcinoma escamoso oculto mediante la utilización del sistema LIFE. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 217-219.
99. Hung J, Lam S, Le Riche JC, Palci OB. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med* 1991; 11: 99-105.
100. Lam S, Hung J, Palcio B. Mechanism of detection of early lung cancer by ratio fluorometry. *Lasers Life Sci* 1991; 4: 67-73.
101. Lam S, MacAuley C, Palcio B. Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques. *Chest* 1993; 103: 12-14.
102. Kato H, Ikeda N. The role of fluorescence diagnosis in the early detection of high-risk bronchial lesions. *J Bronchol* 1998; 5: 273-274.
103. Venmans BJ, Van der Linden H, Van Boxem TJ, Postmus PE, Smit EF, Sutudja TG. Early detection of preinvasive lesions in high-risk patients. A comparison of conventional flexible and fluorescence bronchoscopy. *J Bronchol* 1998; 5: 280-283.
104. Awadh N, McAulay C, Lam S. Detection and treatment of superficial lung cancer by using gamma-aminolevulinic acid: a preliminary report. *J Bronchol* 1997; 4: 13-17.
105. De Blasio F, Prisco C, Pezza A. Utilità degli anticorpi monoclonali nella diagnosi di carcinoma polmonare. *Arch Monaldi Mal Torace* 1990; 45: 195-202.
106. Zhou J, Mulshine JL, Unsworth EJ, Scott FM, Avis IM, Vos MD et al. Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. Identification of heterogenous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody 703D4. *J Biol Chem* 1996; 271: 10.760-10.766.
107. Cameron RB. Malignancies of the lung. En: Cameron RB, editor. *Practical oncology*. Norwalk: Appleton & Lange, 1994; 189-204.
108. Ebert W, Muley TH, Drings P. Does the assessment of serum markers in patients with lung cancer aid in the clinical decision making process? *Anticancer Res* 1996; 16: 2.161-2.168.
109. Partanen R, Koskinen H, Hemminki K. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients who have asbestosis and develop cancer. *Occup Environ Med* 1995; 52: 316-331.
110. Niklinsky J, Furman M, Rapellino M, Chyczewski L, Laudanski J, Oliaro J et al. CYFRA 21.1 determination in patients with non-small cell lung cancer: clinical utility for the detection of recurrences. *J Cardiovasc Surg* 1995; 36: 501-504.
111. Milld EN, Fishman CL, Scholes J, Anderson SE, Rom WN, Jacobson DR. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1.056-1.060.
112. Chillón MJ. Valor de la mieloperoxidasa en el lavado broncoalveolar de cáncer de pulmón [tesis doctoral]. Madrid: UCM, 1999.