

## Valor pronóstico de la pérdida de heterozigosidad en la región 9p21 en el carcinoma broncogénico no microcítico

M.T. Sanz-Casla\*, M.L. Maestro\*, A. Godino\*, I. Zanna\*, A. Torres\*\* y J.L. Balibrea\*\*

Servicios de \*Análisis Clínicos y \*\*Cirugía II. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

### Resumen

La importancia sociosanitaria del cáncer de pulmón radica en su elevada incidencia y mortalidad. En la actualidad se considera el cáncer como el resultado de una acumulación de alteraciones que afectan a diversos genes con distintas funciones celulares. Diversos estudios genéticos han demostrado una pérdida de material genético en la región 21 del brazo corto del cromosoma 9 (9p21), siendo una de las alteraciones genéticas más frecuentemente identificadas en el cáncer humano. Esta región contiene un gen supresor llamado *p16*, que codifica las proteínas *p16* y *p19*.

Se estudió una serie de 98 pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón no microcítico. Se analizó la pérdida de heterozigosidad (LOH) en 9p21 mediante el análisis de polimorfismos de microsatélites. El 23,5% de los pacientes presentaba LOH y/o inestabilidad en 9p21. Contrariamente a lo que se esperaba, los pacientes que no presentaban alteraciones genéticas en *p16* tenían un riesgo relativo de fallecer 1,7 veces mayor ( $p = 0,1$ ) que los que sí presentaban LOH y/o inestabilidad.

**Palabras clave:** Pérdida de heterozigosidad. Cromosoma 9 *p16*. Cáncer de pulmón no microcítico.

(Cir Esp 2001; 70: 6-12)

### Introducción

La importancia del carcinoma broncogénico está basada en dos aspectos fundamentales: su elevada incidencia y su elevada mortalidad. Es la primera causa de muerte por cáncer en el varón y la segunda en la mujer<sup>1</sup>.

Correspondencia: Dra. M.T. Sanz-Casla.  
Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos.  
Dr. Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid.

Aceptado para su publicación en abril de 2001.

### PROGNOSTIC VALUE OF LOSS OF HETEROZYGOSITY AT CHROMOSOME 9P21 IN NON-SMALL CELL BRONCHOGENIC CARCINOMA

The social and public health importance of lung cancer lies in its very high incidence and mortality rate. Cancer is currently believed to be the result of a cumulative process of genetic alterations affecting different genes with diverse cellular functions. Genetic studies have shown loss of genetic material in region 21 of the short arm of chromosome 9 (9p21). This seems to be one of the commonest alterations identified in human cancer. This region contains a suppressor gene, *p16*, which codifies the *p16* and *p19* proteins.

We studied 98 patients with non-small cell lung cancer. Loss of heterozygosity (LOH) in 9p21 was analyzed using trough satellite polymorphism. LOH and/or instability of 9p21 was found in 23.5% of patients. Contrary to what was expected, patients not showing genetic alterations in *p16* had a relative risk of death approximately 1.7 times ( $p = 0.1$ ) higher than those not presenting LOH and/or instability.

**Key words:** Loss of heterozygosity. Chromosome 9p16. Non-small cell lung cancer.

El conocimiento de los factores pronóstico clásicos (tipo histológico, estadio, grado de diferenciación) no nos ha aportado la información suficiente para clasificar los tumores según su agresividad. Esto puede ser debido al diferente comportamiento biológico que presentan estos tumores con el mismo estadio y tipo histológico y, por tanto, es necesario profundizar en el conocimiento de nuevos factores que pueden tener importancia pronóstica<sup>2-5</sup>. Con esta orientación, nuestro grupo de trabajo se ha planteado el estudio de algunos de estos factores biológicos, entre los que destacan las numerosas alteraciones genéticas que presentan las células tumorales de los pacientes con carcinoma broncogénico, a me-

nudo implicadas en estadios precoces del desarrollo tumoral y de cuyo conocimiento puede obtenerse información pronóstica que podría ser útil en la selección de una población de alto riesgo candidata a complementar el tratamiento quirúrgico con medidas adyuvantes más agresivas.

En la actualidad se considera el cáncer como una enfermedad genética, resultante de la acumulación de alteraciones genéticas que participan en el control del crecimiento celular<sup>6,7</sup>. Dentro de estas alteraciones genéticas, la región cromosómica 9p21 está involucrada en inversiones, translocaciones y delecciones heterozigotas y homozigotas, en una gran variedad de líneas celulares malignas, incluyendo las procedentes de gliomas, cáncer broncogénico de células no pequeñas, leucemias y melanomas<sup>8</sup>. Se ha demostrado que la región contiene un gen llamado *MTS1* (supresor múltiple de tumores) que codifica un inhibidor previamente identificado (*p16*) de la cinasa 4 dependiente de la ciclina<sup>9</sup>. La secuencia del gen *MTS1* hallada por Kamb es idéntica a la del gen *p16* hallado por Serrano et al<sup>10</sup>. La proteína *p16* se une al CDK4 e inhibe la capacidad de CDK4 de interaccionar con la ciclina D y estimular el paso a través de la fase G1 del ciclo celular<sup>10</sup>. Las delecciones o mutaciones en el gen *p16* pueden afectar al balance relativo entre el *p16* funcional y la ciclina D, dando lugar a un crecimiento celular anormal<sup>11</sup>. Kamb et al y Nobori et al observaron una alta frecuencia de delecciones y mutaciones del *p16* en muchas líneas celulares tumorales, lo que apoyaba la hipótesis del papel principal del gen *p16* en la inhibición del desarrollo de tumores malignos<sup>9,12</sup>. Es importante señalar que la capacidad del *p16* para inducir la parada del ciclo celular se pierde en células carentes de proteína funcional del gen del retinoblastoma. Así, la pérdida de *p16*, la sobreexpresión de ciclinas, y la pérdida del gen del retinoblastoma tienen efectos semejantes en la progresión de G1, y podrían representar un sendero común en la tumorigénesis<sup>13</sup>. *In vivo*, la presencia de una proteína Rb funcional parece ser necesaria pero no suficiente para otorgar una sensibilidad completa al control del crecimiento celular dependiente de *p16*<sup>9,11,14,15</sup>.

Los mecanismos de inactivación de *p16* son delecciones homozigotas, mutaciones, pérdidas de un alelo e inactivación del otro, probablemente debido a la metilación. A pesar de que otros genes supresores de tumores son inactivados mediante mutaciones puntuales, la mayoría de los estudios coinciden en que las mutaciones de *p16* responden a un mecanismo infrecuente de inactivación<sup>16</sup>. Las pequeñas delecciones homozigotas son un mecanismo de inactivación de *p16* frecuente en muchos tumores<sup>15</sup>. Se han descrito delecciones homozigotas en las siguientes entidades: carcinoma de vejiga, glioma, mesotelioma, leucemia linfoblástica aguda, melanoma, adenocarcinoma de próstata, sarcoma y adenocarcinoma de ovario<sup>15</sup>.

El conocimiento de estos mecanismos podría contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos.

El objetivo de este trabajo es estudiar la pérdida de heterozigosidad (LOH) en la región 9p21 (*locus D9S1747*) en una población de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico mediante el análisis de los polimorfismos de microsatélites.

## Pacientes y métodos

Este estudio prospectivo se ha realizado en 98 pacientes diagnosticados de carcinoma broncogénico no microcítico e intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, entre 1992 y 1996. Los pacientes se incluyeron en un programa de seguimiento.

### Procesamiento de las muestras

Durante el acto quirúrgico se extrajeron dos muestras de tejido pulmonar de cada paciente, una de tejido tumoral y otra de tejido sano alejada de la periferia del tumor. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

### Examen histológico

El examen histológico fue realizado en dos zonas de cada muestra, tanto del tumor como de la parte no tumoral. Los tumores fueron clasificados según los criterios de la clasificación propuesta por la OMS<sup>17</sup> y el estadio tumoral TNM según la modificación descrita por Mountai<sup>18\*</sup>.

### Determinaciones

**Extracción del ADN.** El tejido fue digerido en una solución (SDS al 10%, EDTA 1 mM, TRIS 50 mM y 0,5 mg/ml de proteinasa K) durante 12 h a 37 °C. La extracción del ADN se realizó mediante un método convencional con fenol-cloroforino.

**Estudio de la LOH. Amplificación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR).** La amplificación de cada secuencia se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 50 ng de ADN genómico, 8 µl de tampón estándar para PCR (10 x PCR Buffer II de Roche), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada primer (Progenetic) (tabla 1), 200 µM de dNTP (GeneAmp® dNTPs de Perkin Elmer) y 0,5 U de Taq ADN polimerasa (AmpliTaq® DNA Polimerase de Roche). La amplificación se realizó en un termociclador (GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer) con un ciclo inicial de 5 min a 95 °C para desnaturarizar el ADN. Posteriormente, se realizaron 30 ciclos en los que cada uno comprendía 30 s a 95 °C, 60 s a 55 °C y 60 seg a 70 °C para la elongación. Se realizó un último ciclo a 70 °C durante 10 min para la elongación final. En cada amplificación se incorporó un control negativo.

**Electroforesis y revelado.** Se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en TBE al 0,5%. Además de las muestras, se cargaron un blanco y un *leader* (PhiX 174/Hae III Markers de Promega) para comparar el tamaño de los fragmentos de la amplificación. El gel se reveló con una disolución de nitrato de plata al 0,1%.

### Análisis estadístico

Se obtuvieron los porcentajes totales de LOH, y se realizó la comparación entre la frecuencia de esta alteración y las distintas variables clínicas cualitativas por el método de la  $\chi^2$  o mediante el test de Fisher cuando no se pudo aplicar el primero. Las variables cuantitativas se compararon con la prueba de la *t* de Student. Se calcularon los riesgos relativos como magnitud de la asociación y sus intervalos de confianza del 95%. Para el análisis estadístico de la probabilidad de supervivencia, se utilizó el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se examinaron por el método de rangos logarítmicos. Para los cálculos de la supervivencia, se consideró el tiempo transcurrido entre el momento de la intervención quirúrgica y la fecha de la última revisión o fallecimiento. Mediante un estudio estadístico univariante inicial se seleccionaron los factores con carácter pronóstico. Una vez seleccionados, se aplicó un estudio multivariante mediante un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox que permite conocer los factores pronóstico independientes.

## Resultados

### Descripción de la población

La población objeto de nuestro estudio consta de 98

TABLA 1. Secuencias de los *primers* utilizados en las amplificaciones mediante PCR

Cromosoma	Símbolo del locus	Banda	Primers: sense 5'→3'	Primers: antisense 5'→3'	Temperatura (°C)	Tamaño
9p	D9S1747	21	ATTCAACGAGTGGGATGAAG	TCCAGGTTGCTGCAAATGCC	55	150

TABLA 2. Prevalencia de pérdida de heterozigosidad de *p16* en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico clásicos

Variable	Prevalencia			OR	IC del 95%	p
	%	n				
Sexo						
Varón	10,8	83		Indeterminado	—	1,00
Mujer	0,0	1				
Fumador						0,17
Sí	100,0	79		0,35	0,08-1,47	
No	0,0	4		1		
Tipo histológico						0,007
Adenocarcinoma	0	30		1		
Epidermoide	15,2	46		11,58	5,04-26,57	
Broncoalveolar	66,7	3		101,6	30,14-342,9	
Células grandes	0	3		Indeterminado	—	
Células pequeñas	0	2		Indeterminado	—	
Grado de diferenciación						0,40
Bien	10,5	19		1		
Moderado	13,3	30		1,30	0,33-4,16	
Indiferenciado	3,7	27		0,32	0,08-1,78	
Estadio						0,43
I	9,7	31		1		
II	50,0	2				
IIIA	11,6	43		1,19	0,34-3,59	
IIIB	0,0	6				
IV	0,0	2				
Tamaño						0,39
T1	0,0	7		1		
T2	11,6	43		2,14	0,93-4,89	
T3	13,8	29		2,64	0,87-8,04	
T4	0,0	5		1,36		
Ganglios						0,93
N0	10,2	49		1		
N1	16,7	6		1,76	0,48-10,02	
N2	10,7	28		1,05	0,31-3,90	
N3	0,0	1		2,69	1,10-6,61	
Metástasis						1,00
M0	11,1	81		Indeterminado	—	
M1	0,0	3				

pacientes, 95 varones y 3 mujeres. La edad media fue de 65,8 años, con un rango entre 42 y 84 años. El 9,3% eran no fumadores.

La distribución respecto al tipo histológico de acuerdo con la OMS<sup>17</sup> fue: 55 epidermoide (56,1%), 33 adenocarcinoma (33,7%), 4 de células grandes (4%), 2 de células pequeñas (2%) y 4 broncoalveolar (4%). La clasificación por estadios según la clasificación de Mountain de 1986<sup>18</sup> fue la siguiente: 38 en estadio I (38,8%), 2 en estadio II (2%), 50 en estadio IIIa (51%), 6 en estadio IIIb (6,1%) y 2 en estadio IV (2%).

Con relación al grado de diferenciación la distribución fue así: tumores bien diferenciados 23 (25,8%), moderadamente diferenciados 35 (39,3%) y poco diferenciados 31 (34,8%). De 9 tumores desconocemos su grado de diferenciación.

Según el tamaño tumoral los tumores se clasificaron en: 9 en T1 (9,2%), 50 en T2 (51%), 34 en T3 (34,7%) y 5

(5,1%) en T4. Con relación a la afectación tumoral de los ganglios, se clasificaron en tres grupos: 60 sin afección ganglionar (61,2%), 6 con N1 (6,1%), 31 con N2 (31,6%) y uno con N3 (1%). En el estudio previo a la cirugía se diagnosticaron 2 pacientes con metástasis a distancia (M1).

#### Análisis de la pérdida de heterozigosidad e inestabilidad de 9p21

En este estudio analizamos por separado si nuestros pacientes presentaban LOH y/o inestabilidad en la región 9p21 y lo relacionamos con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos.

La pérdida de heterozigosidad se define como la ausencia de uno de los dos alelos en el ADN tumoral con respecto al ADN de tejido no tumoral en un individuo que es heterozigoto para el carácter en estudio. La inestabi-

TABLA 3. Prevalencia de la inestabilidad en 9p21 en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico clásicos

Variable	Prevalencia				
	%	n	OR	IC del 95%	p
Sexo					
Varón	12,6	95	0,07	0,01-0,86	0,05
Mujer	66,7	3	1		
Fumador					0,003
Sí	10,2	88	0,09	0,02-0,40	
No	55,6	9	1		
Tipo histológico					0,69
Adenocarcinoma	9,1	33	1		
Epidermoide	16,4	55	1,95	0,54-5,82	
Broncoalveolar	25,0	4	3,33	0,68-20,33	
Células grandes	25,0	4	3,33	0,68-20,33	
Células pequeñas	0,0	2	Indeterminado	Indeterminado	
Grado					0,90
Bien	17,4	23	1		
Modrado	14,3	35	0,79	0,23-2,62	
Indiferenciado	12,9	31	0,70	0,21-2,32	
Estadio					0,46
I	18,4	38	1		
II	0,0	2			
IIIA	14,0	50	0,58	0,20-1,66	
IIIB	0,0	6			
IV	0,0	2			
Tamaño					0,58
T1	22,2	9	1		
T2	14,0	50	0,57	0,12-2,06	
T3	14,7	34	0,60	0,12-2,41	
T4	0,0	5	0,27	0,06-1,18	
Ganglios					0,32
N0	18,3	60	1		
N1	0,0	6			
N2	9,7	31	0,38	0,14-1,23	
N3	0,0	1			
Metástasis					1,00
M0	14,7	95	1		
M1	0,0	3	0,80	0,46-1,38	

dad de microsatélites se produce por la presencia de inserciones o delecciones que alteran el patrón de bandas de ADN microsatélite en el tejido tumoral comparado con el tejido sano del mismo paciente.

En nuestra serie de 98 pacientes, encontramos que un 9,2% (9 de 98) presentaron LOH, un 14,3% (14 de 98) presentaron inestabilidad y un 23,5% (23 de 98) presentaron LOH o inestabilidad.

En el análisis de la LOH podemos resaltar que el 66,7% de los tumores broncoalveolares presentaron LOH, el 15,2% de los tumores epidermoides y ninguno de los tumores adenocarcinomas, de células grandes y de células pequeñas ( $p = 0,007$ ) (tabla 2).

En el estudio de la inestabilidad, el 66,7% de las mujeres presentaron inestabilidad y un 12,6% de los varones ( $p = 0,05$ ). El 55,6% de los no fumadores presentaba inestabilidad y el 10,2% de los fumadores ( $p = 0,003$ ) (tabla 3).

En el estudio de ambas alteraciones genéticas de *p16* (LOH y/o inestabilidad) observamos que el 55,6% de los pacientes no fumadores presentaba alguna de estas alteraciones y un 20,5% de los pacientes fumadores ( $p = 0,03$ ). Con relación al tipo histológico, el 75% de los tumores broncoalveolares presentó alguna de estas alteraciones, el 25% de los tumores de células grandes, el 29,1% de los tumores epidermoides, el 9,1% de los tu-

mores adenocarcinomas y ninguno de los tumores de células pequeñas ( $p = 0,02$ ) (tabla 4).

#### Evolución postoperatoria de los pacientes con cáncer de pulmón. Análisis de la influencia pronóstica: supervivencia

De los 98 pacientes de nuestro estudio, 56 murieron como consecuencia de la neoplasia en el transcurso de su seguimiento; en un paciente no se pudo determinar su evolución. Únicamente hemos incluido en nuestro estudio a aquellos pacientes que fallecieron como consecuencia de un cáncer de pulmón. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 47 meses. La supervivencia global al año fue del 67,4% y a los 4 años del 40,6%.

Se estudiaron si las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos tenían relación con la supervivencia global de los pacientes. Los factores pronóstico clásicos que presentaron significado pronóstico fueron el tipo histológico ( $p = 0,04$ ), el grado de diferenciación ( $p = 0,007$ ), el estadio tumoral ( $p = 0,004$ ), la afección ganglionar ( $p = 0,022$ ) y la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ( $p = 0,002$ ).

Observamos una significación pronóstica cuando consideramos las variables LOH e inestabilidad en conjunto ( $p =$

TABLA 4. Prevalencia de pérdida de heterozigosidad y/o inestabilidad en 9p21 en relación con las variables cliniopatológicas y con los factores pronóstico clásicos

Variable	Prevalencia				
	%	n	OR	IC del 95%	p
Sexo					
Varón	22,1	95	0,14	0,01-1,64	0,14
Mujer	66,7	3	1		
Fumador					0,03
Sí	20,5	88	0,21	0,05-0,85	
No	55,6	9	1		
Tipo histológico					0,02
Adenocarcinoma	9,1	33	1		
Epidermoide	29,1	55	4,10	1,33-9,90	
Broncoalveolar	75,0	4	30,0	3,73-110,70	
Células grandes	25,0	4	3,33	0,72-19,28	
Células pequeñas	0,0	2	1,74	0,58-5,23	
Grado de diferenciación					0,56
Bien	26,1	23	1		
Moderado	25,7	35	0,98	0,34-2,70	
Indiferenciado	16,1	31	0,54	0,16-1,91	
Estadio					0,28
I	26,3	38	1		
II	50,0	2			
IIIA	24,0	50	0,77	0,34-1,72	
IIIB	0,0	6			
IV	0,0	2			
Tamaño					0,41
T1	22,2	9	1		
T2	24,0	50	1,10	0,28-3,36	
T3	26,5	34	1,26	0,32-3,85	
T4	0,0	5	0,27	0,06-1,18	
Ganglios					0,72
N0	26,7	60	1		
N1	16,7	6	0,55	0,17-3,15	
N2	19,4	31	0,66	0,25-1,82	
N3	0,0	1	0,89	0,50-1,59	
Metástasis					1,00
M0	24,2	95	Indeterminado	-	
M1	0,0	3			

0,18). Los nuevos factores pronóstico presentaron un efecto protector; así, los pacientes con tumores que presentaban LOH el riesgo relativo (RR) es de 0,7 veces menor ( $p = 0,36$ ), los que presentan inestabilidad tienen un RR 0,8 veces menor ( $p = 0,31$ ) y aquellos con inestabilidad y/o LOH un RR 0,8 veces menor ( $p = 0,18$ ) (tabla 5) (fig. 1).

Una vez evaluadas las variables que influyen en la supervivencia global, realizamos en análisis multivariante según el modelo estadístico de Cox. Como se observa en la tabla 6, los factores que presentaron significado pronóstico independiente en la supervivencia global de los pacientes fueron el estadio tumoral, el grado de diferenciación y la presencia de alguna alteración genética considerada en conjunto. Considerando globalmente todas las alteraciones genéticas, aquellos pacientes que no presentaban ninguna alteración tenían un RR de fallecer 1,7 veces mayor ( $p = 0,1$ ).

En los pacientes diagnosticados en estadio precoz, aquellos que no presentaban alteraciones genéticas en *p16* tenían un RR de fallecer 2,6 veces mayor (IC del 95% 0,8-8) que los que presentaban LOH y/o inestabilidad. En estadios avanzados el RR era 1,3 veces mayor (IC 95% = 0,6-2,8), independientemente del grado de diferenciación.

Al seleccionar los tipos histológicos más frecuentes

(adenocarcinoma y epidermoide), el RR de fallecer en los pacientes que no presentaban alteraciones genéticas en los estadios precoces era de 4,1 (IC del 95% = 1,1-1,1) y de 1,23 (IC del 95% = 0,6-2,6) en estadios avanzados, independientemente del grado de diferenciación.

## Discusión

En el cáncer de pulmón se han observado numerosas alteraciones genéticas<sup>5</sup>. En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de uno de los genes supresores de tumores implicados en la aparición del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), el gen *p16*. Diversos autores han demostrado que *p16* está implicado en la aparición de diversos tipos de tumores humanos como páncreas, esófago, cabeza y cuello, y el CPNM y el melanoma<sup>6</sup>. Nosotros hemos estudiado alguna de las causas de inactivación del gen *p16*: la inestabilidad de microsatélites y la LOH en la región 9p21<sup>10</sup>.

A lo largo de los últimos años se han publicado diversos trabajos con resultados no concluyentes de las alteraciones genéticas más frecuentes en el gen *p16* y su frecuencia e implicación pronóstica en CPNM.

En un principio se pensó que el principal mecanismo

de inactivación de *p16* eran las mutaciones puntuales; sin embargo, éstas suponen sólo el 10%<sup>16</sup>. Las delecciones homozigotas suponen del 20 al 30% de los casos de inactivación del gen<sup>15</sup>.

En 1994, Merlo et al describieron una LOH en la región 9p21 en un 67% de los CPNM estudiados<sup>19</sup>. Sin embargo, a lo largo de estos años se han publicado distintos trabajos con porcentajes de LOH tan dispares como del 0 al 83%<sup>19-27</sup>. En el caso de la inestabilidad de microsatélites, los resultados varían entre un 2 y un 55%<sup>28,29</sup>. En nuestro estudio el 9,2% (9 de 98) y el 14,3% (14 de 98) de los casos estudiados presentaron LOH e inestabilidad, respectivamente, estando estos resultados dentro de este amplio margen recogido en la bibliografía.

Merlo et al y Marchetti et al no observan relación entre las alteraciones genéticas de *p16* y las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos<sup>19,25</sup>. En nuestro estudio observamos que la LOH era más frecuente en los tumores broncoalveolares (66,7%;  $p = 0,003$ ) y la inestabilidad se asoció con el hecho de ser no fumador ( $p = 0,003$ ).

En nuestra serie, el 23,5% de los pacientes (23/98) presentaban alguna alteración genética de *p16* (LOH y/o inestabilidad). Huang et al exponen en su trabajo que, en varios estudios realizados, las alteraciones de *p16* ocurren entre un 27 y un 54% de los CPNM, siendo su significación pronóstica todavía incierta<sup>30</sup>.

Es importante estudiar si la alteración en el gen supresor *p16* influye en el pronóstico de los pacientes afectados de CPNM. La presencia de estas alteraciones en nuestra población es un factor pronóstico independiente en el riesgo de fallecer. Los pacientes diagnosticados de CPNM en estadio precoz presentaban un mayor riesgo de fallecer si no tenían alteración genética en *p16*.

Todavía son muy pocos los estudios realizados sobre el valor pronóstico de las alteraciones genéticas de *p16* o de la expresión de la proteína, que puedan aclarar la implicación de estos hechos en la supervivencia global de los pacientes con CPNM.

Sólo existen publicaciones sobre el valor pronóstico de la expresión de la proteína *p16*, siendo éstos contradictorios. Hommura et al observan que la falta de expresión de la proteína no es un factor pronóstico significativo en la supervivencia global<sup>31</sup>. Por otro lado, autores como

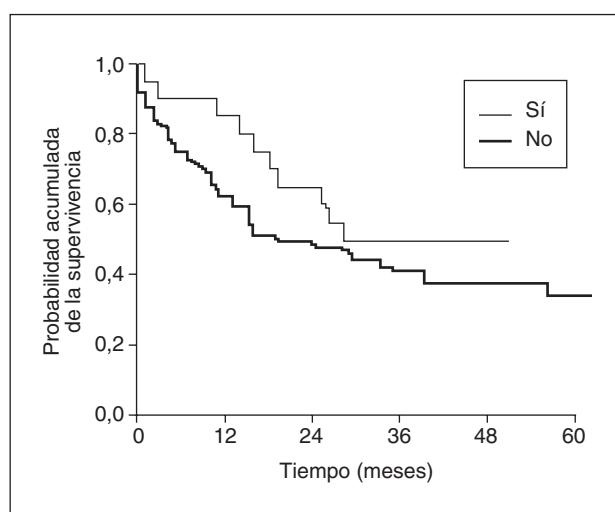


Fig. 1. Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de pérdida de heterozigosidad o inestabilidad. Serie de 98 pacientes con cáncer de pulmón. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

TABLA 6. Análisis multivariante para la predicción del riesgo de fallecer

Variable	Riesgo relativo	IC del 95%	p
Estadio			< 0,001
I + II	1		
III	3,03	1,54-5,94	
Grado de diferenciación			0,02
Bien	1		
Moderado + indiferenciado	2,42	1,07-5,49	
Conjunta			0,10
Sí	1		
No	1,67	0,90-3,12	

Huang et al, Kratzke et al y Taga et al coinciden en que los pacientes con alteraciones en la expresión proteica presentaron una supervivencia menor, sobre todo en estadios iniciales y en tumores epidermoides<sup>24,30,32</sup>. Gerardts et al observaron que los pacientes con una expresión normal de la proteína presentan peor pronóstico, hecho

TABLA 5. Análisis univariante de la supervivencia global acumulada en relación con los nuevos factores pronóstico

Variable	N.º	N.º de muertes	Probabilidad acumulada (%)				RR	IC del 95%	p
			12	24	36	48			
LOH <i>p16</i>							0,76	0,27 2,12	0,36
Sí	9	4	87,5	75,0	50,0	50,0			
Inestabilidad	74	45	62,3	48,1	41,0	37,7	1	0,34 1,77	0,31
No									
LOH + inestabilidad							0,80	0,39 1,57	0,18
Sí	14	6	83,3	58,3	50,0	50,0			
No	80	46	67,4	52,9	43,6	40,6	1		
Sí	23	10	85,0	65,0	50,0	50,0	0,78	0,39 1,57	0,18
No									

LOH: pérdida de heterozigosidad.

que coincide con nuestros resultados, al encontrar que estas alteraciones parecen ser un factor protector en el riesgo de fallecer<sup>33</sup>.

—Las presencia de alteraciones en el gen *p16* parecen \*Nuestros pacientes fueron intervenidos durante los años 1993 y 1996; por tanto, la clasificación por estadios se realizó mediante la clasificación de Mountain de 1986.

ser un hecho frecuente en el CPNM y, además, tienen lugar en estadios precoces de la enfermedad. Por tanto, parece importante intensificar el estudio sobre esta alteración genética en el CPNM con el fin de obtener unos resultados más concluyentes en cuanto a prevalencia y, sobre todo, a la implicación pronóstica.

## Bibliografía

1. Mina D, Higgins G, Glatstein E. En: DeVita V, editor. Cáncer. Principios y prácticas de oncología. Salvat, 14: 371-445.
2. Balibrea JL. Tumores pulmonares. En: Balibrea JL, editor. Tratado de cirugía. Barcelona: Toray, 1988; 1258-1280.
3. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest 1997; 111: 1710-1717.
4. Lipford EH, Eggleston JC, Lillemoen KD. Prognostic factors y surgically resected limited stage non-small cell carcinoma of the lung. Am J Sur Pathol 1984; 8: 357-362.
5. Maestro ML, Rodríguez R, Sanz MT, Torres A, Balibrea JL. Cáncer de pulmón: hacia un nuevo concepto de marcador tumoral. Cir Esp 1998; 63: 53-60.
6. Kern J, Filderman A. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. Clin Chest Med 1993; 14: 31-41.
7. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. J Clin Oncol 1998; 16: 1207-1217.
8. De Vos S, Miller CW, Takeuchi S, Gombart Af, Cho SK, Koeffler HP. Alterations of CDKN2 (p16) in non-small cell lung cancer. Gen Chrom Cancer 1995; 14: 164-170.
9. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harsman K, Tavtigian SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in the genesis of many tumor types. Science 1994; 264: 436-440.
10. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993; 366: 704-707.
11. Liggitt WH, Sidransky D Jr. Role of the *p16* tumor suppressor gene in cancer. J Clin Oncol 1998; 16: 1197-1206.
12. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 1994; 368: 753-756.
13. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996; 274: 1672.
14. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardó C, Beach D, DePinho R. Role of the *INK4a* locus in tumor suppression and cell mortality. Cell 1996; 85: 27-37.
15. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A et al. Frequency of homozygous deletion at *p16/CDKN2* in primary human tumours. Nature Genet 1995; 11: 210-212.
16. Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin Mr, Demetrick DJ et al. Mutations y the *p16/INK4/MTS1*, *P15/MTS2* AND *P18* genes in primary and metastatic lung cancer. Cancer Res 1995; 55: 1448-1451.
17. WHO. Histological typing of tumors. (2.<sup>a</sup> Ed.). Am J Clin Pathol 1982; 77: 123-126.
18. Mountain CF. The new international staging system for lung cancer. Surg Clin NA, 1987; 67: 925-935.
19. Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. Cancer Res 1994; 54: 640-642.
20. Washimi O, Nagatake M, Osada H, Ueda R, Koshikawa T, Seki T et al. In vivo occurrence of *p16* (MTS1) and *p15* (MTS2) alterations preferentially in non-small-cell lung cancers. Cancer Res, 1995; 55: 514-517.
21. Shapiro G, Edwards C, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker D et al. Reciprocal Rb inactivation and *p16INK4* expression in primary lung cancers and cell lines. Cancer Res 1995; 55: 505-509.
22. Xiao S, Li D, Corson J, Vijg J, Fletcher J. Codeletion of *p15* and *p16* genes in primary non-small cell lung carcinoma. Cancer Res 1995; 55: 2968-2971.
23. Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Misina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H et al. Altered *p16INK4* and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. Cancer Res 1996; 56: 5557-5562.
24. Kratzke R, Greatens T, Rubins J, Maddaus M, Niewoehner D, Niehans G et al. Rb and *p16INK4a* expression in resected non-small cell lung tumors. Cancer Res 1996; 56: 3415-3420.
25. Marchetti A, Buttitta F, Peelegrini S, Bertacca G, Chella A, Carnicelli V et al. Alterations of *p16* (MTS1) in node-positive non-small cell lung carcinomas. J Pathol 1997; 181: 178-182.
26. Betticher D, White G, Vonlanthen S, Liu X, Kappeler A, Altermatt H et al. G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. Int J Cancer 1997; 74: 556-562.
27. Gorgoulis V, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Kyroudi A, Veslemes M et al. Alterations of the *p16-pRb* pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas. Am J Pathol 1998; 153: 1749-1765.
28. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. Cancer Res 1995; 55: 28-30.
29. Ahrendt S, Chow J, Xu L, Yang S, Eisenberger C, Esteller M et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. J Nat Can Inst 1999; 91: 332-339.
30. Huang C, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Miyake M. *p16* protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. Br J Cancer 2000; 82: 374-380.
31. Hommura F, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Mishina T, Hiroumi H, Ogura S et al. Predictive value of expression of *p16INK4A*, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. Br J Cancer 1999; 81: 696-701.
32. Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of *p16INK4* expression in nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 1997; 80: 389-395.
33. Gerardts J, Fong K, Zimmerman P, Maynard R, Minna J. Correlation of abnormal Rb, P16ink4a, and expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. Clin Can Res 1999; 5: 791-800.