

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE FACTOR H DEL
COMPLEMENTO EN LAVADO BRONCOALVEOLAR
COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES
CON CÁNCER DE PULMÓN**

Tesis doctoral presentada por

José Javier García López

Dirigida por

Prof. Dr. José María Peña Sánchez de Rivera

Dr. Manuel Quintana Díaz

Dr. Marcelino Sánchez Casado

Madrid, 2012

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada con datos de pacientes atendidos en la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona) y el Hospital Nuestra Señora del Prado (Talavera de la Reina), con la colaboración de diferentes neumólogos y biólogos y bajo la dirección de los doctores José María Peña Sánchez de Rivera, Manuel Quintana Díaz y Marcelino Sánchez Casado.

El estudio que compone esta Tesis ha sido realizado sin financiación alguna ni interés comercial conocido.

Don José María Peña Sánchez de Rivera, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, D. Manuel Quintana Díaz, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Don Marcelino Sánchez Casado, Doctor en medicina por la Universidad de Salamanca

HACEN CONSTAR

Que La Tesis Doctoral “UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE FACTOR H DEL COMPLEMENTO EN LAVADO BRONCOALVEOLAR COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN” ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por Don José Javier García López y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

La presente Memoria ha sido revisada por los que subscriben encontrándola apta para ser presentada y defendida ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste donde proceda, firman el presente documento en Madrid a 19 de mayo de 2012

Dr. José María Peña

Dr. Manuel Quintana

Dr. Marcelino Sánchez

A Diana, Javier y Paloma, por hacerme feliz cada día.

A mis padres Jesús y Pilar.

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS..... | 15 |
| I.INTRODUCCIÓN..... | 19 |
| I.A. El cáncer primario de pulmón..... | 21 |
| I.A.1. Epidemiología..... | 21 |
| I.A.2. Etiología..... | 23 |
| I.A.3. Clasificación anatómo-patológica..... | 25 |
| I.A.4. Genética y biología molecular..... | 27 |
| I.A.4.1. Evolución molecular del cáncer de pulmón..... | 30 |
| I.A.4.2. Genes involucrados en el cáncer de pulmón..... | 31 |
| I.A.4.3. Expresión anormal de proteínas..... | 33 |
| I.A.5. Diagnóstico y estadificación..... | 35 |
| I.A.5.1. Radiografía de tórax..... | 38 |
| I.A.5.2. TC de tórax..... | 39 |
| I.A.5.3. Resonancia magnética..... | 41 |
| I.A.5.4. PET y TC-PET..... | 42 |
| I.A.5.5. Broncoscopia..... | 44 |
| I.A.5.5.1. Tumores centrales..... | 46 |
| I.A.5.5.2. Tumores periféricos..... | 46 |
| I.A.5.5.3. La broncoscopia en la estadificación | |

| | |
|---|----|
| mediastínica..... | 46 |
| I.A.5.5.4. Lavado broncoalveolar..... | 47 |
| I.A.5.6. Punción aspiración pulmonar percutánea..... | 49 |
| I.A.5.7. Otras técnicas..... | 49 |
| I.A.5.8. Detección de cáncer de pulmón basada en biomarcadores..... | 50 |
| I.A.6. Pronóstico..... | 53 |
| I.B. El factor H del complemento..... | 54 |
| I.B.1. Respuesta inmune: papel del complemento..... | 54 |
| I.B.1.1. Activación del sistema del complemento..... | 55 |
| I.B.1.2. Algunas funciones fundamentales del sistema del complemento..... | 60 |
| I.B.2. Factor H en sujetos sanos..... | 62 |
| I.B.3. Variaciones del gen del factor H y su relación con diversas patologías no tumorales..... | 66 |
| I.B.4. Factor H en patología tumoral..... | 67 |
| I.B.5. Factor H en cáncer de pulmón..... | 67 |
| II. PLANTEAMIENTO, HIPOTÉSIS Y OBJETIVOS..... | 69 |
| II.A. Planteamiento del problema..... | 71 |
| II.B. Hipótesis..... | 74 |
| II.C. Objetivos..... | 75 |
| III. PACIENTES Y MÉTODOS..... | 77 |
| III.A. Tipo de estudio. Diseño..... | 79 |
| III.B. Población en estudio..... | 79 |
| III.C. Procedimiento broncoscópico y obtención de muestras..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| III.D. Examen citológico convencional..... | 80 |
| III.E. Mediciones de marcadores..... | 81 |
| III.F. Variables de estudio..... | 82 |
| III.G Recogida de datos..... | 84 |
| III.H. Análisis estadístico..... | 84 |
| III.I. Aspectos ético-legales..... | 85 |
| | |
| IV. RESULTADOS..... | 87 |
| IV.A. Estudio descriptivo..... | 89 |
| IV.B. Comparaciones entre grupos..... | 92 |
| IV.C. Evaluación del factor H como prueba diagnóstica..... | 99 |
| IV.D. Validación interna..... | 106 |
| | |
| V. DISCUSIÓN..... | 109 |
| | |
| VI. CONCLUSIONES..... | 123 |
| | |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 129 |
| | |
| VIII. APÉNDICES..... | 155 |
| VIII.A. Apéndice I: Consentimiento informado..... | 157 |
| VIII.B. Apéndice II: Artículo basado en el presente trabajo..... | 161 |

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Resulta muy difícil nombrar a todas las personas que de una forma u otra han contribuído a que esta tesis vea la luz.

En primer lugar debo nombrar al Dr. Marcelino Sánchez Casado, sin duda quien ha empujado más para que este trabajo salga adelante, con su esfuerzo desinteresado, su ánimo constante y, en una palabra, su amistad con mayúsculas. Junto con él debo incluir también al Dr. Manuel Quintana, sin cuyo apoyo no hubiera sido posible, y al Dr. José María Peña, cuyas valiosas aportaciones mejoraron notablemente el resultado del trabajo.

A los investigadores del Departamento de Histología del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra, dirigidos por el Profesor Dr. Luis Montuenga, verdadero motor de la idea de este trabajo, con especial mención a los doctores Rubén Pío y Daniel Ajona, que aportaron todo su conocimiento y esfuerzo a lo largo de su prolongado desarrollo.

A los doctores Schmidt y Witt del hospital berlinés de la Charité por ceder amablemente las muestras para la cohorte de validación interna de este trabajo.

A mis compañeros (neumólogos, enfermeras, personal de laboratorio) en los distintos hospitales donde se fraguó este trabajo, tanto en la Clínica Universidad de Navarra como en el Hospital Nuestra Señora del Prado, por su ayuda y apoyo constante.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

A los pacientes que desinteresadamente y muchas veces con entusiasmo aportaron su colaboración para que fuera posible realizar este estudio.

A todos ellos, gracias.

I. INTRODUCCIÓN.

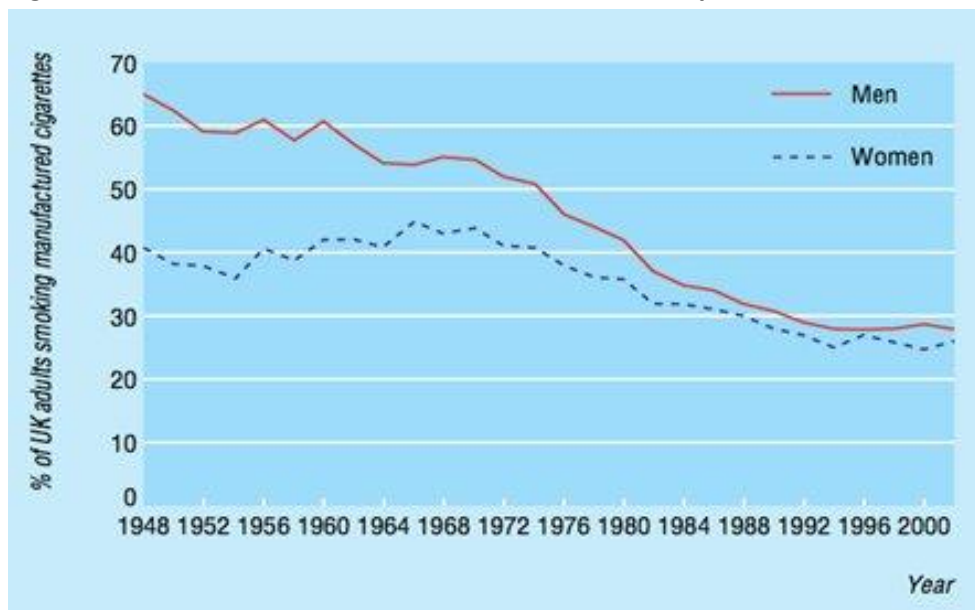
I.A. El cáncer primario de pulmón.

I.A.1. Epidemiología.

El cáncer de pulmón permanece como la primera causa de muerte por neoplasia en varones occidentales. En las mujeres, en la actualidad, ha alcanzado también la primera posición en la causa de muerte por cáncer en EEUU, entre otros países (1).

La epidemiología de la enfermedad está condicionada por su principal causa: la exposición al tabaco. Esto condiciona el aumento de su incidencia en la primera mitad del siglo XX, paralelo al consumo masivo de tabaco a partir de los años cincuenta y condicionando una nueva pandemia (2-4). Durante todo el siglo XX se produce un aumento constante de su incidencia a lo que se une una reducción modesta de la mortalidad a pesar de la mejora en la atención sanitaria. Esta decepcionante trayectoria ha dado paso al renacimiento de cierto grado de esperanza al disminuir en los últimos años (a partir de los años 80) el consumo de tabaco en países como EEUU o el Reino Unido (figura 1). Esto se ha correlacionado con un decremento de la mortalidad de cáncer de pulmón en el sexo varón, no ocurriendo así en las mujeres. Es de esperar que estos resultados se generalicen a ambos sexos y a otros países si se produce una reducción del tabaquismo, que en la mayoría de los países europeos se resistía a disminuir significativamente, con algunas excepciones, hasta bien entrados los años 90, como es el caso de España .

Figura 1. Evolución del consumo de tabaco por sexo en Reino Unido.



La epidemiología del cáncer de pulmón es un proceso muy dinámico, no solo en cuanto a su incidencia, sino también en los cambios histológicos producidos (aumento frecuencia del adenocarcinoma y disminución del carcinoma epidermoide) (5), el enorme avance a nivel genético y en la biología molecular y el estudio de los factores predisponentes (biomarcadores, etc.)

La supervivencia media a los 5 años establecida en 2001 fue del 15.7%, cambiando muy poco con respecto a 1976 (12.5%). La cifra varía mucho según el momento del diagnóstico, desde un 49% en enfermedad local, a un 16% con afectación regional y un 2% con metástasis a distancia (6).

Con respecto al nivel socioeconómico, se ha observado una relación con menores ingresos y nivel educativo, incluso tras ajustar por tabaquismo, lo que podría estar relacionado con factores como exposición a otros tóxicos o factores dietéticos (7).

Con respecto a la distribución geográfica, aunque constituye el cáncer más

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

diagnosticado en todo el mundo, todavía es más frecuente en los países desarrollados, con una tendencia inversa (según disminuye en éstos, aumenta en los países en vías de desarrollo) (8).

1.A.2. Etiología.

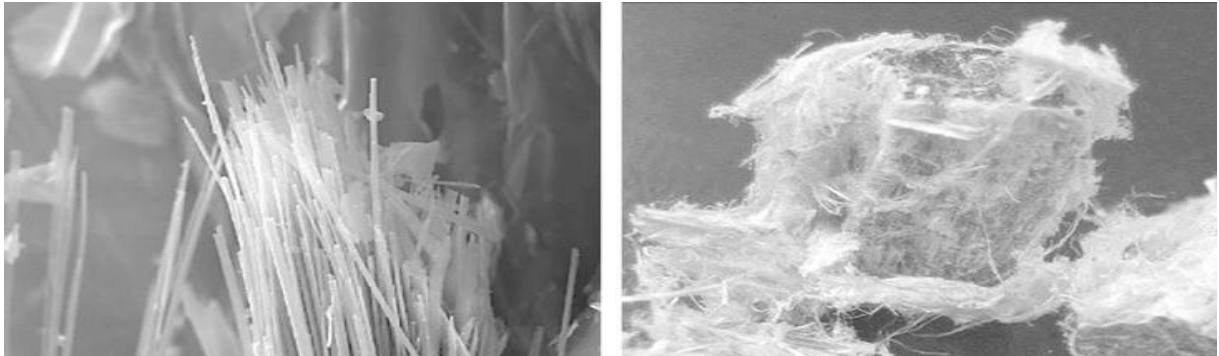
Estos datos de la evidencia epidemiológica unidos a la comprensión de los fundamentos biológicos del cáncer de pulmón han demostrado fuera de toda duda la relación causal entre tabaco y cáncer de pulmón, convirtiéndose en la causa de muerte por cáncer prevenible más importante. Desde las primeras investigaciones causales tabaco-cancer de pulmón en la Alemania nazi (9), las evidencias no han hecho más que acumularse (10-12). La exposición puede ser activa o pasiva; los fumadores pasivos presentan un riesgo aumentado de cancer (un 30% más si su conyuge es fumador y un 17% si se fuma en su lugar de trabajo) (13-15). Los fumadores presentan un riesgo 20 veces mayor que los no fumadores de padecer cáncer de pulmón y es proporcional a la cantidad de cigarrillos fumados, el tiempo del hábito tabáquico y el tabaco utilizado y la forma de inhalarlo (disminuyendo si se fuman puros o pipa). El riesgo disminuye de forma continuada tras abandonar el hábito tabáquico, aunque nunca llega a igualarse con los no fumadores (16).

Otros carcinógenos son factores etiológicos demostrados. El más importante es el *radón*, siendo el colectivo de mineros bajo tierra el más expuesto, estando considerada la segunda causa de cáncer de pulmón. Otras sustancias relacionadas son arsénico, asbesto (figura 2), níquel o hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros agentes (17). De forma global, el 90% de todos los casos se relacionan con el

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

tabaco, y entre el 9 y el 15% presentan tóxicos ocupacionales (en solitario o asociados al tabaco), justificando el radón en un 10% de ellos.

Figura 2. Microscopia electrónica de otros carcinógenos.



Otros posibles agentes investigados comprenden los humos de combustión doméstica en países en desarrollo, la exposición al diesel y otros contaminantes en el medio urbano, las radiaciones e incluso la dieta (una dieta rica en frutas y verduras podría tener un cierto papel protector) (18). Existen pues sinergias entre los diferentes carcinógenos ambientales (tabaco, asbesto, etc.). El papel de la polución ambiental podría alcanzar un 1-2%, no existiendo datos fiables en relación al impacto de factores dietéticos (19, 20).

Es importante subrayar que existen dos factores a considerar en el cáncer de pulmón. Uno de ellos es la ya referida *exposición ambiental*, que se produce a través de todas estas noxas patológicas que estamos describiendo. Pero no debemos olvidar, y más adelante incidiremos en esto, que el segundo factor a considerar es una *susceptibilidad individual*, que matizará la agresión del agente externo.

1.A.3. Clasificación anatomopatológica.

Existen cuatro tipos básicos histológicos: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas o microcítico. El carcinoma epidermoide (figura 4) ha sido desbancado como el más frecuente por el adenocarcinoma (figura 5) (21). Los mecanismos que conducen al desarrollo de cada categoría histológica son desconocidos. Los diferentes tipos histopatológicos se asocian a determinadas características. El tabaco se asocia a todos los tipos histológicos, aunque lo hace con más fuerza al microcítico (figura 6) y al escamoso. En la exposición al radón es más frecuente el microcítico. En los no fumadores el más frecuente es el adenocarcinoma.

Aparte de los tipos histológicos básicos, existen otros tumores mucho menos frecuentes, y comparten, en general, un curso clínico con mejor pronóstico.

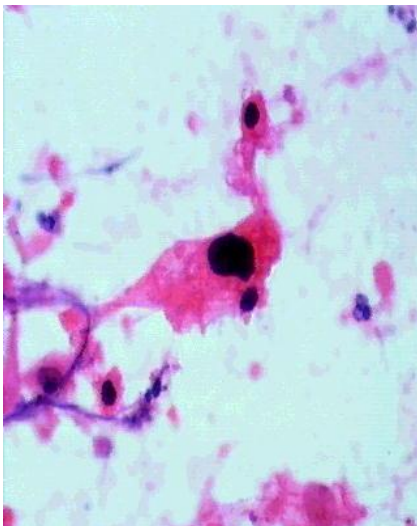


Figura 3. Histología del carcinoma epidermoide

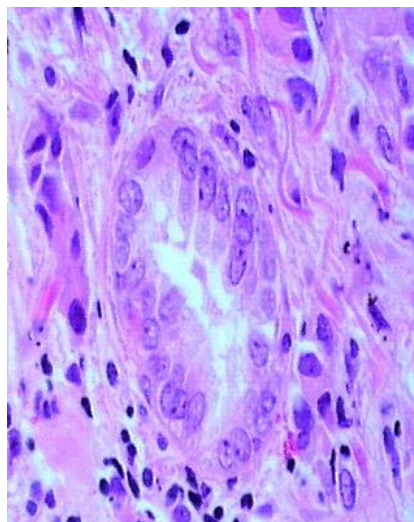


Figura 4. Histología adenocarcinoma.

La clasificación general de las neoplasias de pulmón se encuentra en la tabla 1.

El *carcinoma epidermoide* suele estar localizado a nivel central y presenta una tendencia a la exfoliación, por lo que en ocasiones se puede detectar en el examen citológico. El carcinoma adenoescamoso es una variante que puede producir mucina. Es el tumor más relacionado con el tabaco, y se puede con frecuencia acompañar de un cuadro clínico de neumonitis obstructiva con atelectasia.

El *adenocarcinoma* suele presentar una localización periférica. Sus variantes clásicas son: acinar, papilar y bronquioloalveolar. El adenocarcinoma bronquioloalveolar ha sido considerado una entidad clínico-patológica diferente que puede presentarse como un nódulo solitario, como una enfermedad multifocal o como afectación rápidamente progresiva de todo el pulmón. En la actualidad se le ha clasificado sencillamente como adenocarcinoma de crecimiento lepidico, que se caracteriza también por la frecuente presencia de la apoproteína del surfactante SAP 35.

El *carcinoma de células grandes* es el tipo menos frecuente. Es un tumor pobremente diferenciado y que presenta una peor evolución que el resto de carcinomas de pulmón de células no pequeñas. Tiene un comportamiento clínico parecido al del adenocarcinoma.

El *carcinoma de célula pequeña (microcítico)* se origina a partir de células basales neuroendocrinas del epitelio bronquial (células de Kulchitsky). Constituye el 20% y suele tener una localización central. Tres subtipos: oat-cell (el 90% de los carcinomas de células pequeña), tipo mixto de célula pequeña y de célula grande y combinado de células de carcinoma microcítico y no microcítico. La diferenciación neuroendocrina

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

suele ponerse de manifiesto con técnicas de tinción inmunohistoquímica específicas para enolasa neuronal específica, cromogranina A (figura 6, recuadro inferior derecho) y antígeno carcinoembrionario.

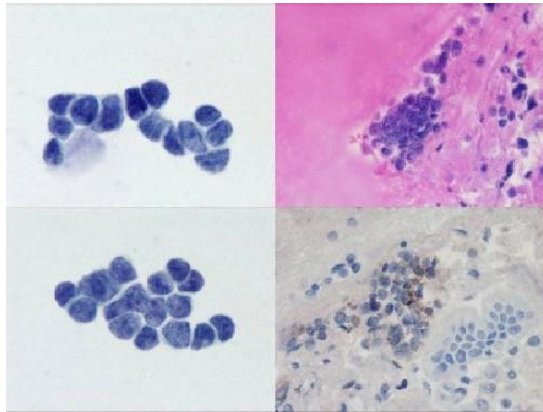


Figura 5. Histología carcinoma microcítico.

1. A.4. Genética y biología molecular.

Los estudios epidemiológicos que muestran una asociación entre la historia familiar y el riesgo mayor de padecer un cáncer de pulmón constituyen la primera evidencia de la susceptibilidad para padecer cáncer de pulmón. Esto se ha remarcado por el hecho de que solo una minoría de fumadores desarrollan cáncer de pulmón.

Los estudios genéticos llevados a cabo han objetivado un riesgo incrementado de sufrir distintas mutaciones. Entre ellas destaca el gen p53, gen retinoblastoma (22, 23, 24) o el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (25). Recientemente, tres grandes estudios han identificado una asociación entre varios polimorfismos de

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

nucleótido único (variación en 15q24-15q25.1) y la susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón (26, 27, 28). Esta región genética incluye dos genes que codifican subunidades de los receptores nicotínicos de la alfa-acetilcolina, que se afecta por la exposición a la nicotina (29).

El riesgo de padecer cáncer de pulmón no solo aparece como consecuencia de una alteración genética, sino que también aumenta con la reducción de la capacidad de reparación del ADN dañado, en particular cuando se ve potenciada por la exposición al humo del tabaco (30). En la tabla 2 se muestran las anomalías encontradas en la actualidad de los genes involucrados en el desarrollo de los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón.

| Tabla 2. Anomalías genéticas encontradas en los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón. | | | |
|--|--------------|---|-------------------------|
| (Modificada de Roy et al.) (31) | | | |
| ALTERACIÓN | EPIDERMOIDE | ADENOCARCINOMA | MICROCÍTICO |
| PRECÁNCER | | | |
| LESION HISTOLÓGICA | DISPLASIA | HIPERPLASIA ADENOMATOSA ATÍPICA | CAMBIOS NEUROENDOCRINOS |
| CAMBIO GENETICO | MUTACIÓN P53 | MUTACIÓN KRAS (1), MUTACIÓN DOMINIO EGFR KINASA (2) | SOBREEXPRESIÓN c-MET |
| CÁNCER | | | |
| Mutación KRAS | Muy rara | 10-30% | Muy rara |
| Mutación BRAF | 3% | 2% | Muy rara |
| | | | |
| EGFR | | | |

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

| | | | |
|-------------------------|----------|----------|-------------|
| Mutación dominio kinasa | Muy rara | 10-40% | Muy rara |
| Amplificación(3) | 30% | 15% | Muy rara |
| Mutación variante III | 5% (4) | Muy rara | Muy rara |
| HER2 | | | |
| Mutación dominio kinasa | Muy rara | 4% | Muy rara |
| Amplificación | 2% | 6% | desconocido |
| Fusión ALK (5) | Muy rara | 7% | desconocido |
| MET | | | |
| Mutación | 12% | 14% | 13% |
| Amplificación | 21% | 20% | desconocido |
| Amplificación TTF-1 | 15% | 15% | Muy rara |
| Mutación p53 | 60-70% | 50-70% | 75% |
| Mutación LKB1 | 19% | 34% | Muy rara |
| PIK3CA | | | |
| Mutación | 2% | 2% | Muy rara |
| Amplificación | 33% | 6% | 4% |

(1) Fumadores.

(2) No fumadores.

(3) Se incluyen copias aumentadas desde amplificación o polisomía y se refiere a cánceres resecaos. Son más altas en tumores con enfermedad metastásica. Se han objetivado en lesiones displásicas escamosas pero no en precursores de adenocarcinomas.

(4) Mutaciones de variante III EGFR se han detectado únicamente en escamosos, siendo sensibles a inhibidores de tirosina-kinasa EGFR.

(5) Específico de adenocarcinoma hasta este momento.

I.A.4.1. Evolución molecular del cáncer de pulmón.

El daño tisular ocurre inicialmente como cambios genéticos y epigenéticos (mutaciones, metilaciones, pérdidas de heterocigosidad, etc.) así como en patrones de inflamación o de apoptosis, que pueden conducir a proliferaciones aberrantes y cambios premalignos (displasia). Cambios adicionales pueden repercutir en la angiogénesis, y acabar finalmente en la aparición del cáncer. Muchos de los cambios observados en fases tempranas se objetivan también en los tumores avanzados.

Es importante saber que los cambios en algunos genes se inician en el tejido no tumoral, precediendo probablemente la evolución clonal epitelial. Estos últimos cambios se observan sobre todo en fumadores. El tejido normal que rodea al tumor no microcítico presenta en muchas ocasiones diferentes cambios: metilaciones, cambios epigenéticos, amplificación c-Myc, pérdida de la heterocigosidad, inestabilidad de microsatélites. Estos cambios del tejido peritumoral se relacionan con la recurrencia local, sugiriendo que podría realizarse en el futuro un análisis molecular de los márgenes quirúrgicos que podría identificar a los pacientes que se beneficiarían de un tratamiento de adyuvancia.

Existen eventos tempranos en el desarrollo del carcinoma no microcítico, como pérdida de la heterocigosidad en la región cromosómica 3p21.3 (Ras), 3p 14.2 (FHIT), 9p 21 (p16), 17p13 (p53). Todos estos genes son supresores de los tumores. Estos patrones difieren en las neoplasias escamosas (son mucho más frecuentes las deleciones en el cromosoma 3) y en el adenocarcinoma, en donde se observan mutaciones en EFGR Kinasa (no fumadores) o KRAS (fumadores) (31).

I.A.4.2. Genes involucrados.

A continuación se repasa sucintamente algunos de los genes que presentan peculiaridades conocidas en la aparición y desarrollo del cáncer de pulmón:

* *Gen del receptor del factor de crecimiento tumoral (EGFR)*: regula importantes procesos celulares (proliferación, apoptosis, angiogénesis e invasión). Frecuentemente sobreexpresado en el carcinoma no microcítico. Varios ensayos farmacológicos dirigidos directamente contra el EGFR están actualmente en marcha (erlotinib, cetuximab). Son frecuentes las mutaciones en el dominio kinasa (32). Son más frecuentes en mujeres y no fumadores. Se asocia con mejor pronóstico en carcinoma no microcítico (33). Amplificación de EGFR se observa en displasias, sobre todo de alto grado. Los cambios en EGFR tienen impacto tanto en el desarrollo de la enfermedad como en su tratamiento. Determinadas mutaciones (pe. deleciones en exon 19, típicas de adenocarcinoma) aumentan la sensibilidad a los inhibidores de EGFR tirosina-kinasa, como erlotinib y gefitinib, en cambio la mutación T790M se asocia a resistencia a los mismos. Mutaciones en variante III de EGFR aparecen en el carcinoma escamoso, y se asocian a mal pronóstico (34, 35). En los estudios, la eliminación de la expresión mutante de EGFR condujo a la regresión de los tumores, sugiriendo que precisan actividad mutante persistente de este gen para desarrollarse (36).

* *HER2*: Mutaciones y amplificaciones de HER 2 se han identificado en pacientes con adenocarcinoma. Igual que el EGFR, se asocia con el sexo femenino, no fumadores, y asiáticos (37). Su amplificación se asocia con sensibilidad a inhibidores de la EGFR tirosina kinasa. En cambio las mutaciones se asocian a resistencia a dichos

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

fármacos, aunque también a sensibilidad a la terapia dirigida a HER2. Mutaciones en HER4 se han observado en 2-3% de pacientes asiáticos, varones y fumadores (38)

* *K-RAS*: mutaciones activas descritas en el adenocarcinoma, aunque no es exclusivo de carcinomas no microcíticos, asociándose con resistencia a inhibidores de la tirosina-kinasa y quimioterapia. La mayoría se presentan en fumadores, son tempranas, apareciendo incluso en lesiones premalignas, marcando generalmente un peor pronóstico.

* *PI3K-Akt-mTOR*: Las alteraciones son tempranas y se manifiestan en la displasia. La inhibición de Akt previene carcinogénesis en modelos animales. Asimismo, inhibidores de mTOR frenan la carcinogénesis en ratones con mutación K-ras (39).

* *LKB1*: Aparece mutado frecuentemente en el cáncer no microcítico, y se piensa que actúa como supresor interactuando con p53 y modulando la actividad de la proteína multifuncional kinasa AMPK, entre otras posibles acciones. Parece implicado en la génesis tumoral y en el desarrollo de metástasis (40). Las mutaciones aisladas de LKB1 en ratones no indujeron cáncer, y bajos niveles de LKB1 se asociaron con displasia en alto grado, sugiriendo un papel temprano en el desarrollo de lesiones premalignas. Aparecen en el 34% de los adenocarcinomas y el 19% de los epidermoides, asociándose a tabaquismo y a mutación de K-ras, y siendo virtualmente excluyente con mutaciones de EGFR.

* *TTF1*: la amplificación del factor 1 de transcripción tiroideo (thyroid transcription factor 1, TTF1) en la región 14q13.3 fue el evento focal más frecuente

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

observado en un análisis genético de alta resolución en adenocarcinoma (41). Codifica un factor esencial para la formación de neumocitos tipo II.

* *VEGF*: sus niveles en células epiteliales de fumadores aumentan con la progresión de la displasia bronquial, asociándose con alta densidad de microvasos en displasia, hiperplasia atípica y carcinoma in situ.

I.A.4.3. Expresión anormal de proteínas.

La sobreexpresión de proteínas es una característica de los tumores, y en el cáncer de pulmón existen contextos bien caracterizados. Tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como su receptor (EGFR) aparecen sobreexpresados en más del 60% de carcinomas no microcíticos. En el caso de los tumores de células pequeñas, se ha objetivado la expresión de factores neuroendocrinos, incluyendo los péptidos bombesina-like (GRP/BN; gastrin-releasing peptide/bombesin-like peptides); se detecta en la mitad de carcinomas microcíticos, estando implicados en su crecimiento (se inhibe el crecimiento con anticuerpos monoclonales contra GRP). La expresión de RNAm del receptor de GRP es más frecuente en mujeres que en hombres no fumadores, y más frecuente en grandes fumadoras, sugiriendo una temprana activación en mujeres en respuesta a exposición a tabaco, pudiendo resultar un factor en la mayor susceptibilidad de la mujer fumadora al cáncer de pulmón (42).

Varias ciclinas están sobreexpresadas en el cáncer de pulmón:

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

- la ciclina D1 está en la mayoría de las líneas celulares de carcinoma no microcítico.

- La ciclina B1 se ha detectado en un 22% de tumores no microcíticos en estadios tempranos, asociándose a peor supervivencia que aquellos con bajos niveles de dicha ciclina.
- La ciclina E aparece sobreexpresada en alrededor del 50% de tumores no microcíticos, especialmente escamosos (43).

Otras proteínas del ciclo celular se han objetivado sobreexpresadas en cáncer de pulmón:

- *Kinasa ciclina dependiente* (Cyclin-dependent kinase, CDK4), en el 90% de carcinomas no microcíticos, asociándose a pobre diferenciación.

- *Cdc25*: se han identificado al menos 3 genes en humanos, observándose sobreexpresión del cdc25A en un 60% de tumores no microcíticos, y del cdc25B en el 45% de dichos tumores.

- IF-4G, IF-4E, factores de iniciación de traslación.

- Activación de la telomerasa (implicada en la prolongación de la vida celular al favorecer la acumulación de daño molecular ante la agresión de los carcinógenos y en el incremento de las tasas de proliferación celular) en un 80% de carcinoma de células pequeñas y un 85% de no microcíticos. Se observa en lesiones premalignas, sugiriendo su implicación en el inicio de la carcinogénesis. La subunidad catalítica de la telomerasa hTERT se ha investigado como posible biomarcador. (42)

I.A.5. Diagnóstico y estadificación.

El diagnóstico del cáncer de pulmón tiene dos vertientes: la tipificación anatomopatológica de la neoplasia y el estudio de extensión (*estadificación*). Para conseguir este último objetivo se utiliza la clasificación TNM (tablas 3 y 4) (44).

En el carcinoma de células pequeñas se utiliza una clasificación más sencilla pero con importantes implicaciones prácticas terapéuticas. Se divide a los pacientes en dos estadios (45):

1. Enfermedad en estadio limitado (EL): el tumor confinado en el hemitórax de origen, el mediastino y los ganglios supraclaviculares; la zona de afectación se puede abarcar dentro de un portal tolerable de radioterapia. Los pacientes con derrame pleural tienen un pronóstico intermedio entre EL y EG con metástasis hematógenas y se clasificarán como enfermedad M1 (o EG).
2. Enfermedad en estadio generalizado (EG): se disemina más allá de las áreas supraclaviculares y está demasiado diseminado para incluirlo en la definición de EL. Incluyen los pacientes con metástasis a distancia (M1) (45).

Tabla 3. CLASIFICACIÓN TNM.

| | |
|------------------|---|
| T | Tx: Tumor que no puede ser evaluado* |
| (TUMOR PRIMARIO) | To: No evidencia de tumor primario |
| | Tis: Carcinoma in situ |
| | T1: Tumor cuyo diámetro mayor es de 3 cm. o menos, rodeado de |

pulmón o pleura visceral sana, y sin evidencia broncoscópica de invasión proximal a un bronquio lobar**.

T1a: menor o igual a 2 cm

T1b: entre 2 y 3 cm

T2: Tumor > 3 cm. en su diámetro mayor, afectando el bronquio principal, a 2 cm. o más de la carina, o invade la pleura visceral o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hacia el hilio, pero sin afectar todo el pulmón

T2a: entre 3 y 5 cm.

T2b: entre 5 y 7 cm

T3: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal, o un tumor en el bronquio principal a < 2 cm. de la carina, pero sin invadirla, o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón. Tumor con un nódulo satélite en el mismo lóbulo pulmonar del tumor primario. O bien cualquiera de los descriptores del T2 pero mayor de 7 cm

T4: Tumor de cualquier tamaño con invasión de mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, esófago, cuerpo vertebral, carina, o tumor con nódulos en lóbulos distintos del pulmón homolateral

N

Nx: Los ganglios no pueden ser evaluados.

(GANGLIOS
LINFÁTICOS
REGIONALES)

N0: No se demuestran metástasis en los ganglios regionales.

N1: Metástasis en ganglios peribronquiales y región hilar ipsilateral e intrapulmonares por extensión directa del tumor.

N2: Metástasis en ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.

N3: Metástasis en ganglios mediastínicos o hiliares contralaterales, escalenos contralaterales o supraclaviculares.

M

Mx: La presencia de metástasis no puede ser evaluada.

(METÁSTASIS
A DISTANCIA)

M0: No metástasis conocidas a distancia.

M1:

M1a: nódulo/s tumoral/es separado/s en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno.

M1b: metástasis distantes.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

*Tumor demostrado por presencia de células malignas en secreciones bronquiales, pero no visualizado por radiología o broncoscopia.

**El infrecuente tumor superficial de cualquier tamaño en el que su componente invasivo está limitado a la pared bronquial y que puede extenderse proximal al bronquio principal, es clasificado como T1.

La mayoría de los derrames pleurales asociados al cáncer de pulmón son debidos al tumor. No obstante, hay un pequeño grupo de pacientes en los que el estudio citopatológico del líquido pleural no evidencia tumor a este nivel. En estos casos, el líquido no es hemorrágico ni tampoco es un exudado. Cuando hay estos elementos y la orientación clínica es de un derrame no relacionado directamente con el tumor, este debería ser excluido como elemento de estadificación y la enfermedad clasificarse como T1, T2 o T3.

Tabla 4. Estadios.

| | |
|--------------|---------------------|
| Estadio 0 | Carcinoma in situ |
| Estadio IA | T1 N0 M0 |
| Estadio IB | T2a N0 M0 |
| Estadio IIA | T2b N0 M0 |
| | T1 N1 M0 |
| | T2a N1 M0 |
| Estadio IIB | T2b N1 M0 |
| | T3 N0 M0 |
| Estadio IIIA | T3 N1 M0 |
| | T1-2-3 N2 M0 |
| | T4 N0-1-2 M0 |
| Estadio IIIB | T1-2-3-4 N3 M0 |
| Estadio IV | M1, cualquier T o N |

El diagnóstico del cáncer de pulmón debe ser iniciado con una anamnesis exhaustiva y una exploración física completa, dirigidas a detectar las manifestaciones clínicas,

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

síntomas y signos descritos previamente. La tabla 5 muestra la frecuencia de aparición de alguno de estos signos y síntomas al diagnóstico (46).

Tabla 5. Manifestaciones clínicas iniciales del cáncer de pulmón.

| | |
|---------------------------|--------|
| Tos | 17-21% |
| Hemoptisis | 12-21% |
| Dolor torácico | 16-20% |
| Disnea | 2-12% |
| Disfonía | 3-5% |
| Síndrome de vena cava | 1-3% |
| Anorexia, pérdida de peso | 5-7% |
| Dolor extratorácico | 6-10% |
| Síntomas neurológicos | 3% |
| Asintomáticos | 2-5% |

Es característica de esta patología la importancia del concurso de las pruebas de imagen, decisivas a la hora de plantear el diagnóstico y el estadiaje de la enfermedad, que marcarán el tratamiento y pronóstico. Veremos a continuación las más relevantes.

1.A.5.1. Radiografía de tórax.

Debido a su accesibilidad, suele ser el primer paso diagnóstico del cáncer de pulmón, pudiendo ser realizada directamente desde el primer escalón sanitario (atención

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

primaria). Las manifestaciones radiológicas pueden clasificarse en tres grandes grupos (47):

a) *Anormalidades de la región hilar*: prominencia o aumento de la masa/densidad hilar y masa hilar o perihiliar .

b) *Alteraciones del parénquima pulmonar*: nódulo (≤ 4 cm de diámetro), masa (> 4 cm), masas múltiples, hipertransparencia de un lóbulo o segmento, infiltrado pulmonar persistente y evidencia de obstrucción bronquial (colapso o neumonitis).

c) *Alteraciones de las__estructuras intratorácicas extrapulmonares*: ensanchamiento o masa mediastínica, erosión o destrucción de costillas o vértebras, derrame pleural y/o elevación de un hemidiafragma.

1.A.5.2. Tomografía computarizada (TC) de tórax.

Permite evaluar las características de la lesión (presencia de calcificación o grasa en un nódulo o masa, cavitación), su localización y la relación con estructuras vecinas (figura 6). Es muchas veces imprescindible para elegir la técnica de obtención de la muestra e incluso para orientar la dirección del instrumental (pinza, aguja, etc.) durante la realización de la técnica correspondiente. Es superior a la radiografía de tórax en la evaluación de los hilios, del mediastino y de las estructuras de la pared torácica. Además, permite la posibilidad de evaluar todo el tórax y el abdomen a la vez que la lesión pulmonar. Los actuales TC multicorte detectan nódulos de hasta menos de 5 mm, permitiendo reconstrucciones multiplanares y tridimensionales (figura 7), mejorando la posibilidad de definir afectación pleural, caracterizar lesiones

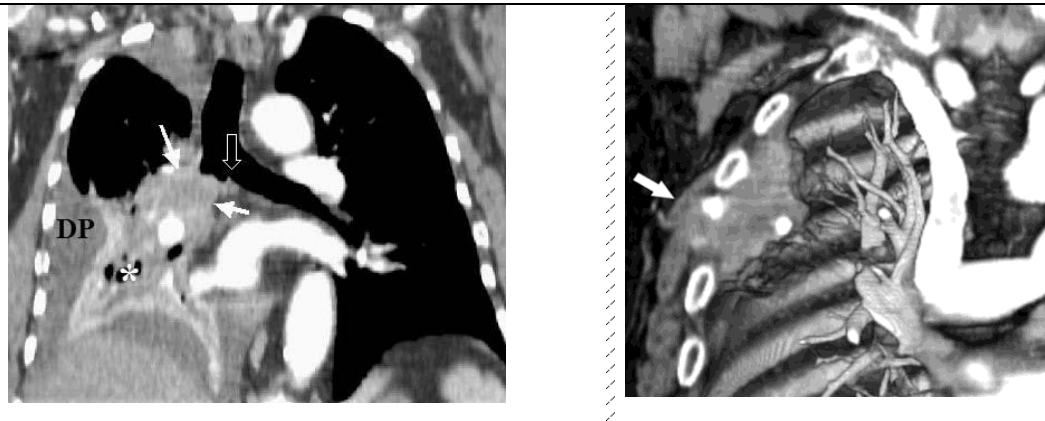
Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

peridiafragmáticas o realizar una broncoscopia virtual todo ello con una reducción sustancial del tiempo de realización de la prueba (48).

Desde el punto de vista técnico, se ha demostrado la ventaja de realizar el TC con contraste, especialmente para el estudio del mediastino y debe incluir las regiones hepática y suprarrenal (49). Respecto al intervalo de los cortes, lo habitual son 10 mm desde vértices pulmonares a glándulas suprarrenales, realizando algunos grupos cortes de 5 mm en hilios y región aortopulmonar para caracterizar mejor los ganglios linfáticos .

Numerosos estudios han evaluado el valor del TC en la estadificación del mediastino. En la mayoría de ellos, el principal criterio para la valoración de la afectación mediastínica es la presencia de adenopatías mayores de 10 mm de diámetro menor (50). Los resultados en cuanto a la valoración de la prueba diagnóstica en un reciente metanálisis (51) son: sensibilidad 0,57 (IC95% 0,49-0,66); especificidad 0,82 (IC95% 0,77-0,86); valor predictivo positivo (VPP) 0,56; y el valor predictivo negativo (VPN) 0,83. Por ello, y debido a su alta resolución espacial, la TC de tórax se considera una prueba diagnóstica muy útil para la confirmación histológica del mediastino, ya que permite la selección de las adenopatías para la punción-aspiración o para la mediastinoscopia (52).

Figuras 6 y 7. Evaluación de la extensión y afectación en las neoplasias pulmonares.



1.A.5.3 Resonancia magnética (RM).

Su utilidad es mucho más limitada que la de la TC, la RM puede ser útil para determinar el grado de invasión de estructuras vasculares o mediastínicas, así como para caracterizar los tumores del sulcus, o incluso posible afectación del diafragma o del canal espinal. Entre sus desventajas se encuentran la pobre resolución espacial o la alteración por los movimientos respiratorios, que puede motivar la sobreestimación del tamaño de los ganglios linfáticos (53). Otras limitaciones generales de la técnica son su mala tolerancia en claustrofóbicos y la contraindicación en pacientes con marcapasos o válvulas protésicas.

La secuencia T1 se utiliza para delimitar los planos grasos y mejorar la resolución espacial, y en T2 para la detección de infiltración tumoral de estructuras vecinas. Generalmente se utiliza contraste con gadolinio para mejorar su rentabilidad diagnóstica (54).

1.A.5.4. PET y TC-PET.

Además de aportar imagen, el PET da un paso más en el diagnóstico y aporta información sobre la actividad de las células en estudio. El reactivo utilizado habitualmente es 18F-Deoxiglucosa (FDG), análogo de la glucosa marcado con fluorina emisora de positrones. La mayoría de los tumores (excepto carcinoides y bronquioloalveolar) tienen un metabolismo aumentado y captan más FDG que los tejidos circundantes, emitiendo un elevado número de positrones. La utilidad de esta técnica ha sido evidenciada ampliamente: la sensibilidad alcanza un 96% (rango 72-100%); la especificidad es algo menor (77,8%; rango 67-100%) (55). La resolución del PET está establecida en un máximo de 5-8 mm, por lo que en el momento actual no se considera indicado en lesiones < 10 mm.

En lo que se refiere a estadificación, el PET es netamente inferior a cualquier otra prueba de imagen para evaluar el tumor primario (T). Sin embargo, tiene gran eficacia para el derrame pleural (sensibilidad 94-95%; especificidad 67-94%) (56, 57). En la estadificación del mediastino (N), ha sido ampliamente validada (sensibilidad 84%; especificidad 93%), con clara superioridad sobre el TC (58).

El riesgo de falsos positivos (21%) aconseja la comprobación histológica, especialmente en ausencia de enfermedad metastásica, por condicionar el tratamiento. Por otra parte, su escasa resolución espacial puede inducir errores (por ejemplo, separar un ganglio del tumor primario próximo), aunque se subsana por la introducción del PET-TC. En caso de PET negativo, el valor predictivo negativo es tan alto (94%) que se admite sin confirmación histológica (59).

En la detección de metástasis (M), su papel no es bien conocido. Diversos estudios encuentran detección de lesiones extratorácicas hasta en un 21% con PET-TC, de los que la mitad eran metástasis y el resto lesiones benignas o bien otros tumores (60). Por ello, la confirmación histológica es muchas veces necesaria, especialmente en localizaciones metastásicas infrecuentes (bazo, axila, páncreas, etc.) Un caso especial son las glándulas suprarrenales, donde tienen una elevada sensibilidad (95-100%) y especificidad (80-100%). De igual modo, es tan sensible como la gammagrafía para las metástasis óseas, pero mucho más específica (98%) (59).

Por último, el PET o PET-TC (figura 8) puede motivar una variación en el estadiaje, y lo que es más importante, en el tratamiento, en un número variable de pacientes (entre un 25-50% según las series publicadas) por lo que se está incorporando cada vez más a la práctica clínica habitual, especialmente en aquellos pacientes potencialmente operables (tabla 6).

Tabla 6. PET-FDG en la estadificación y cambio de tratamiento.

| Estudio | Número pacientes | Cambios de estadio (%) | Impacto en el tratamiento (%) |
|------------|------------------|------------------------|-------------------------------|
| Bury | 109 | 34 | 25 |
| Hicks | 153 | 43 | 35 |
| Hoekstra | 57 | 30 | 19 |
| Pieterman | 102 | 62 | – |
| Schmucking | 63 | – | 52 |

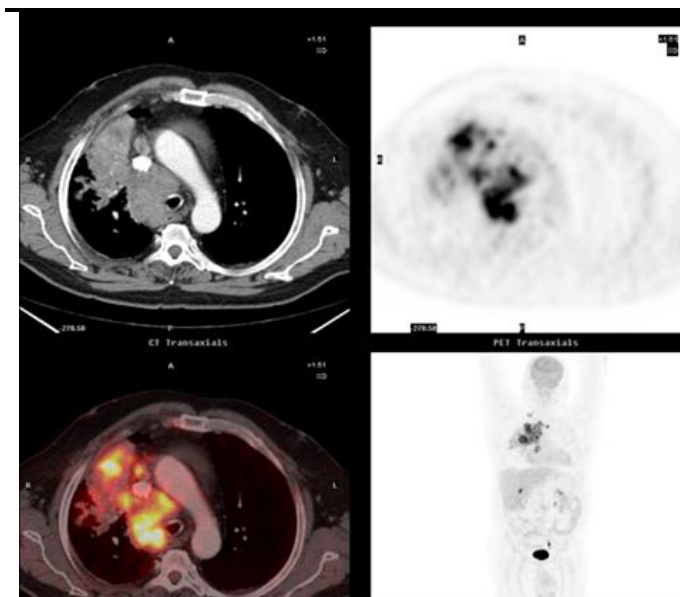


Figura 8. TAC-PET.

1.A.5.5. Broncoscopia.

Es en muchas ocasiones la técnica de elección para el diagnóstico histológico del cáncer de pulmón. Es una prueba mínimamente invasiva, no requiere ingreso hospitalario y permite la exploración directa del árbol bronquial hasta el nivel subsegmentario y la indirecta (a través del instrumental) del resto del pulmón. En una broncoscopia normal, los bronquios se mueven libremente con los movimientos respiratorios y su calibre disminuye durante la espiración. Una rigidez bronquial localizada puede ser el resultado de una infiltración del bronquio por un proceso tumoral o traducir una reacción cicatricial postinflamatoria.

Hay que tener en cuenta que los signos broncoscópicos de neoplasia son muy variables y pueden ser inespecíficos. Se han descrito dos signos fundamentales de neoplasia: masa e infiltración (figura 9) (61). Se pueden distinguir tres grados de masa:

- Grado I: superficie lisa y coloración uniforme rosada.
- Grado II: coloración uniforme pero de superficie granulosa

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

– Grado III: coloración y superficie irregular y mamelonada, siendo ésta la imagen más sugerente de tumoración maligna.

Una *infiltración* es una lesión más o menos extensa de la superficie de la pared bronquial, sin límites bien definidos. Tiene varios grados de lesión, de menor a mayor probabilidad de malignidad:

– Grado I: mucosa con cambios mínimos con respecto a la zona sana.

– Grado II: coexisten dos de las siguientes alteraciones: aumento del grosor, enrojecimiento, superficie irregular o alteraciones de los relieves longitudinales.

– Grado III: aparecen tres de las alteraciones descritas.

La imagen de compresión extrínseca (una protrusión de la pared bronquial con bordes obtusos y que conserva una mucosa de características normales) es el resultado de una lesión expansiva peribronquial que puede ser tumoral o inflamatoria (62).

Las técnicas diagnósticas empleadas en cáncer de pulmón son: broncoaspirado, lavado broncoalveolar, cepillado, biopsia bronquial y punción aspiración con aguja fina transbronquial.

La rentabilidad de la broncoscopia varía dependiendo del tipo de lesión. A efectos prácticos, podemos dividir los tumores en centrales (visibles endoscópicamente) y periféricos. La sensibilidad aumenta con la combinación de las diferentes técnicas.

1.A.5.5. 1. Tumores centrales.

La biopsia presenta en solitario una sensibilidad del 74% en un reciente metaanálisis de 20 estudios; la sensibilidad del cepillado alcanzaba un 59%, y los broncoaspirados un 48%. La combinación de los tres consigue una rentabilidad del 88% (63).

1.A.6.5. 2. Tumores periféricos.

Los resultados son más pobres que en el grupo anterior. Los cepillados alcanzan la mayor sensibilidad (52%), seguidos de la biopsia transbronquial (46%) y el broncoaspirado/lavado broncoalveolar (43%) (63). Se están incorporando nuevas técnicas a la broncoscopia para la obtención de muestras en lesiones periféricas, como son el navegador y la eco-broncoscopia, aunque todavía restringidas en su acceso pero con cada vez más evidencias de su utilidad.

1.A.5.5.3 La broncoscopia en la estadificación mediastínica

La PAAF transbronquial se ha establecido como una técnica imprescindible para el estudio del cáncer de pulmón (figura 13), tanto de forma ciega como guiada por eco-broncoscopia. La punción ciega presenta una sensibilidad de hasta un 76%, y una especificidad aún mayor (96%) (51). Las punciones transbronquiales y transtraqueales ciegas presentan una gran variabilidad, y son muy dependientes del entrenamiento del broncoscopista, el equipo y el patólogo. Oscila entre un 56 y un 76% (63, 64, 51). La introducción de la ecobroncoscopia en tiempo real ha elevado dichos valores en series publicadas recientemente, acercándose a la mediastinoscopia en sensibilidad y especificidad (85% y 100% respectivamente) (65). Cabe mencionar aquí la utilidad de la punción guiada por ecografía por vía esofágica, que alcanza una sensibilidad del

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

alrededor del 80% y una especificidad cercana al 90 % en estaciones ganglionares accesibles (66).

Existe una controversia sobre si el TC debe preceder siempre a la realización de una broncoscopia en cáncer de pulmón. La mayoría de las publicaciones encuentran una mayor rentabilidad tras realizar el TC pasando la sensibilidad de un 56 a un 80% o de un 71% a un 89% (67, 68).

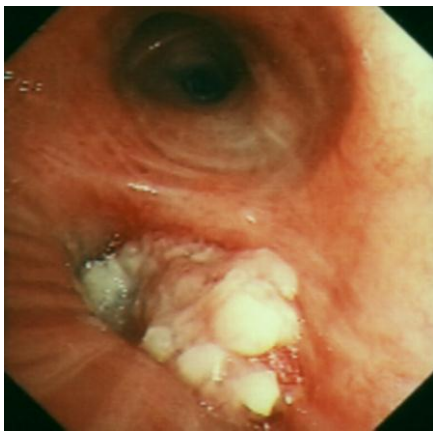


Figura 9. Lesión exofítica endobronquial

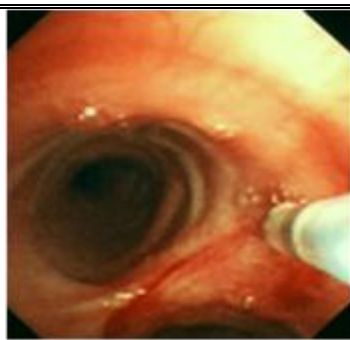


Figura 10. PAAF transbronquial

1.A.5.5.4 Lavado broncoalveolar (LBA).

La técnica descrita inicialmente por Reynolds y Newball en 1974, fue concebida como procedimiento para analizar las células inmunes e inflamatorias del tracto respiratorio inferior tanto del pulmón normal como de varios tipos de patología

intersticial (69). Al no estar definitivamente estandarizada se dificulta la comparación de resultados entre distintos autores. En esencia, consiste en la instilación a través del broncoscopio de un volumen (generalmente entre 100 y 200 ml) de suero fisiológico a nivel de un segmento/subsegmento pulmonar (de preferencia en el lóbulo medio o llingula por ser segmentos declives en posición de decúbito). Parece razonable optar por segmentos con mayor afectación según el estudio radiológico simple o el TAC torácico. El líquido para el lavado se instila en alícuotas de 20 a 50 ml con una jeringa que recogerá mediante aspiración manual lo instilado; o mediante aspiración mecánica suave (presión de unos 5 cm. de agua) (70). El uso del LBA para obtener muestras citológicas en cáncer de pulmón ha sido estudiado por distintos grupos (tabla 7) (71).

Tabla 7. Uso del LBA para la citología del cancer de pulmón.

| Autor | Casos | % LBA diagnóstico |
|-------------|-------|----------------------|
| Strover | 22 | 45 |
| Striz | 430 | 52 |
| Woth | 99 | 37 |
| Baglin | 21 | 62 |
| Linder | 71 | 24 |
| Schaberg | 21 | 14 |
| Shiner | 71 | 24 |
| Pirozynsky* | 145 | 65 |
| De Gracia* | 55 | 33 |

* Únicamente tumores periféricos

Además, se ha utilizado ampliamente para el estudio de marcadores no celulares en cáncer y otras patologías (proteínas, material genético, citoquinas, inmunoglobulinas...) desde los años 90 del siglo pasado hasta la actualidad, por permitir el acceso al espacio alveolar (72, 73). La buena correlación entre el tipo de células inmunes e inflamatorias obtenidas mediante el LBA y las observadas en muestras de biopsia pulmonar abierta, la buena tolerancia del procedimiento y la relativa ausencia de complicaciones importantes son factores que han contribuido a la expansión de su utilización.

I.A.5.6 Punción-aspiración pulmonar percutánea.

Es, probablemente, la técnica diagnóstica más utilizada en los tumores periféricos, ya que su rentabilidad supera el 90%, incluyendo lesiones menores de 2 cm de diámetro (74, 75). El control radioscópico es más simple, asequible y barato, aunque hoy día es preferible el control mediante TC por su mayor seguridad y fiabilidad para localizar la lesión. La aguja suele ser fina (20-22G), suficiente para alcanzar un diagnóstico citológico del CB con la menor morbilidad posible. La complicación más frecuente es el neumotórax, que se produce en un 12-30% de los casos. La hemoptisis es infrecuente y de escasa cuantía (76).

I.A.5.7 Otras técnicas.

En algunos casos no conseguimos diagnosticar el CB con las técnicas referidas, por lo que nos veremos obligados a indicar alguno de los procedimientos quirúrgicos habituales: mediastinoscopia, mediastinotomía, toracoscopia o incluso la toracotomía.

I.A.5.8 Detección de cáncer de pulmón basada en biomarcadores.

Marcadores en la vía aérea.

El diagnóstico de cáncer de pulmón en el momento actual se basa en sospecha clínica, prueba de imagen y confirmación histológica. En los últimos años asistimos a un intento por encontrar biomarcadores que puedan cooperar en el diagnóstico e incluso la detección precoz (screening) de cáncer de pulmón.

Se ha investigado en el análisis de esputo, por su nula invasividad e información directa sobre la vía aérea, buscando proteínas sobreexpresadas. Presenta el problema de la escasa representatividad de la muestra en relación a la vía aérea inferior. Se ha utilizado la PCR, buscando mutaciones en K-ras o p53, alteraciones de microsatélites, o metilaciones aberrantes en genes supresores (p16, FHIT).

Posteriormente, el lavado broncoalveolar ha sido empleado como técnica que obtiene mucha más riqueza en la muestra, además de garantizar el acceso a la vía aérea inferior. Uno de los estudios más interesantes es el de Fielding (77), que detectaba sobreexpresión de proteínas ribonucleares heterogéneas (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins- hnRNPs) en LBA, obteniendo mayor rendimiento que la citología con la detección de sobreexpresión de hnRNP A2/B1, además de detectar la presencia de neoplasia en muestras con células epiteliales bronquiales metaplásicas, con una sensibilidad del 96% y especificidad del 82%. La complejidad del test y la interpretación de los datos es por el momento una barrera para el salto desde el laboratorio a la práctica clínica de este tipo de procedimientos (42).

Marcadores en sangre

Genéticos

La detección de alteraciones moleculares en sangre tiene la ventaja de poder obtener la muestra de forma sencilla. Se han detectado incluso células cancerígenas circulantes (más frecuentes en estadios avanzados). Utilizando técnicas de PCR, se ha objetivado expresión de RNAm de EGFR, raro en sanos y frecuente en cánceres de pulmón. El antígeno carcinoembrionario, la citoqueratina 19 y otros péptidos también han sido estudiados en sangre. De forma lógica, se consideró que el plasma era un medio más apropiado que la sangre total para buscar alteraciones genéticas (alteraciones de microsatélites, niveles de DNA circulante, que incluso correlacionaban con la situación clínica de los pacientes, DNA con pérdidas de heterozigosidad, RNA mensajero tumoral, o metilaciones aberrantes de DNA) (78).

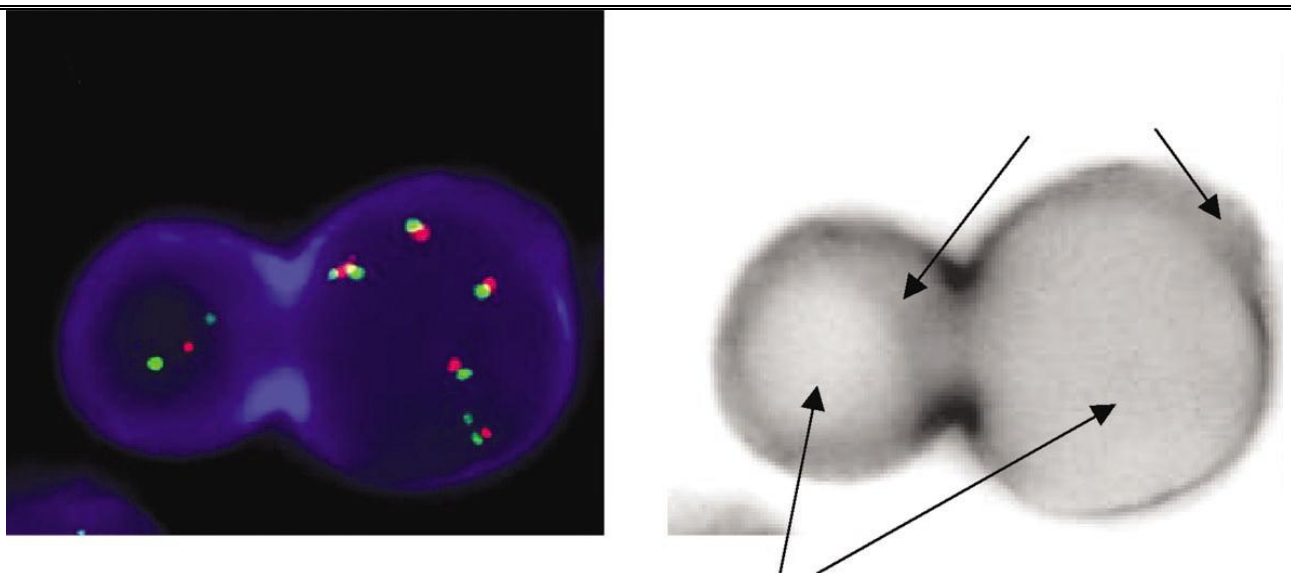
Proteínas.

Algunos marcadores proteicos son utilizados habitualmente en la práctica clínica, a pesar de su baja sensibilidad y especificidad (por ejemplo, antígeno carcinoembrionario, CEA), habiéndose estudiado numerosos péptidos o combinaciones de los mismos con objeto de incrementar su rentabilidad diagnóstica, sin conseguir por el momento resultados relevantes. Por otra parte, algunas proteínas sobreexpresadas o con estructuras alteradas provocan reacciones autoinmunes en forma de autoanticuerpos, encontrándose por ejemplo AC anti p-53 en pacientes con mutaciones del gen homónimo, entre otros.

Perspectivas para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.

El desarrollo de la genética y de las técnicas de análisis y detección de expresión genética (microarrays, SAGE-serial analysis gene expression), permite vislumbrar un horizonte a medio plazo de mejora en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón (figura 11). En combinación con herramientas como la proteómica o la metabonómica (hoy prácticamente confinadas a los laboratorios de investigación) prometen revolucionar el diagnóstico e incluso el tratamiento, determinando perfiles genéticos o moleculares personalizados. Un ejemplo de ello podría ser el marcador HER2 en cáncer de mama.

Figura 11. Imagen de FICTION sobre una línea celular de cáncer de pulmón. La tinción azul corresponde al antígeno de superficie MNF116. La señal roja corresponde al gen TP53 y la verde al cromosoma. Imagen en blanco y negro resultado de la inversión del color, que permite distinguir el contorno nuclear.



I.A.6 Pronóstico.

Las tasas de supervivencia para el cáncer de pulmón son muy pobres. Para seguidos en Inglaterra hasta el año 2000, el 21,45% de los hombres y 21,8% de las mujeres estaban vivos al año del diagnóstico, y solamente un 5,5% se encontraban vivos a los 5 años. La media europea es algo mejor (en unos 5 puntos porcentuales), manteniendo cifras muy similares a 5 años a las de los años 70 (4).

Esta supervivencia está muy significativamente determinada por el estadio al diagnóstico, y por la posibilidad o no de recibir tratamiento quirúrgico. La tabla 8 muestra supervivencias en tumores no microcíticos tratados quirúrgicamente. Por otra parte, en una reciente publicación (79), la supervivencia a 5 años alcanzaba un 10,4%. La mediana de supervivencia para el 89.6% restante era de 7 meses. El estadio al diagnóstico es el factor pronóstico más importante, resultando decisivo para la supervivencia.

Tabla 8. Supervivencia en los tumores no microcíticos tratados mediante cirugía según estadio (4).

| | | Estadio clínico | | Estadio patológico | |
|------------|-----|-----------------|--------|--------------------|--------|
| | | 1 año | 5 años | 1 año | 5 años |
| Estadio I | IA | 91% | 61% | 94% | 67% |
| | IB | 72% | 38% | 87% | 57% |
| Estadio II | IIA | 79% | 34% | 89% | 55% |
| | IIB | 61% | 24% | 78% | 39% |

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

La supervivencia de los carcinomas de células pequeñas se muestra en la tabla 9 y, como observamos, las tasas de supervivencia son menores.

Tabla 9. Supervivencia de los carcinomas microcíticos (79).

| | Enfermedad limitada | Enfermedad extendida |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| Respuestas globales | 85% | 50-60% |
| Respuestas completas | 50-60% | 20% |
| Mediana de supervivencia | 15-20 meses | 8-13 meses |
| Supervivencia a 5 años | 10-13% | 1-2% |

I.B. El factor H del complemento.

I.B.1. Respuesta inmune: papel del complemento.

Ya antes del fin del siglo XIX, Ehrlich había usado el término "complemento" para designar la actividad del suero que podía complementar la capacidad de los anticuerpos específicos de lisis bacterias. Pero es Jules Bordet quien descubre (1895) este componente, caracterizado frente a los anticuerpos por su termolabilidad. En 1907 Ferrata comienza a caracterizar algunos de sus componentes recurriendo a métodos de diálisis. Por motivos meramente cronológicos, los componentes iban recibiendo denominaciones a base de números tras la letra "C" conforme se iban descubriendo. Por esta razón, su orden de actuación no guarda en general relación con su nomenclatura.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

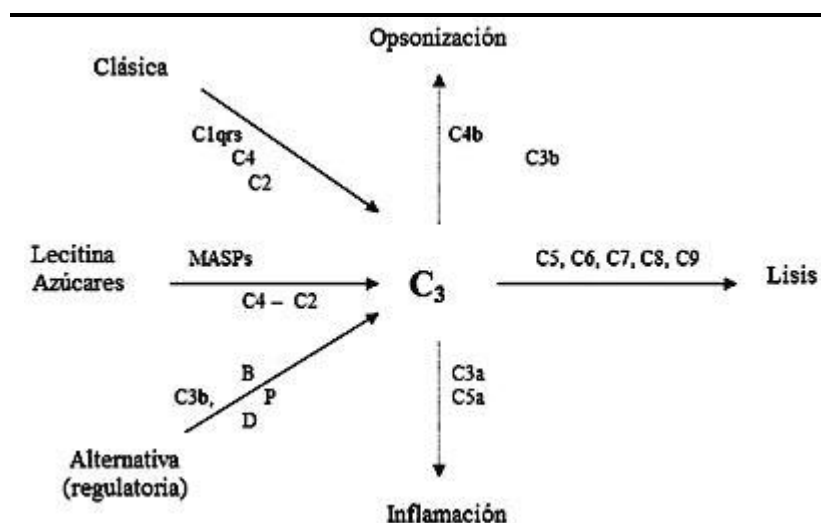
En la ruta clásica (incluyendo el sistema de ataque a la membrana), los componentes son (según su orden de actuación): C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9.

Muchos de ellos son proenzimas (zimógenos) que requieren su rotura proteolítica para convertirse en enzimas activas. Cuando un componente se escinde proteolíticamente en dos, el fragmento de mayor tamaño se designa colocando tras la denominación del componente original una "b"; el fragmento de menor tamaño se designa con una "a" tras el nombre del elemento original. Ej.: la rotura del C3 genera un fragmento grande, denominado C3b y un fragmento pequeño, el C3a. La excepción es el C2. En la ruta alternativa, los componentes se suelen llamar *factores*, y en muchos casos su nomenclatura es a base de una letra mayúscula: factor B, factor D, factor H, factor P (80).

I.B.1. 1. Activación del Sistema de Complemento.

La activación del complemento puede dividirse en cuatro vías: la vía clásica, la vía de la lectina, la vía alternativa y la vía de ataque a la membrana (vía lítica) (figura 12).

Figura 12. Mecanismo de activación del complemento.



Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

Tanto la vía clásica como la alternativa conducen a la activación de C5 convertasa y resultan en la producción de C5b que es esencial para la activación de la vía de ataque a la membrana.

Vía clásica.

Fue la primera vía de activación descubierta, y bajo condiciones fisiológicas normales, la activación de esta vía es iniciada por el complejo antígeno-anticuerpo. Una sola molécula de inmunoglobulina M (IgM) sobre una superficie antigénica, o dos moléculas de inmunoglobulina G (IgG), que han reaccionado con el antígeno, pueden unirse y activar el primer componente de la vía C1, que está compuesta por tres proteínas diferentes (C1q, C1r y C1s) mantenidos juntos por iones calcio. Estas y los demás componentes continúan activándose en cascada poniendo en marcha todo un sistema de reacciones hasta C9, aunque el orden de los números no corresponde a la secuencia de la reacción.

Vía alternativa.

Llamada así porque fue descubierta posterior a la vía clásica, aunque filogenéticamente es probable que sea la más antigua y para su activación no requiere la presencia del anticuerpo por lo que es un mecanismo de defensa importante en los estadios iniciales de la infección cuando todavía no se han sintetizado cantidades importantes de anticuerpos. Funciona de forma continua a un bajo nivel y solo en presencia de determinados factores se amplifica. Esta vía se encuentra en dos estados, de reposo y en activación.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

En estado de reposo, en condiciones normales, en el plasma, el factor C3 se escinde continuamente y de forma lenta, en un proceso que se denomina marcapasos de C3, dando lugar a C3b y quedando así su enlace tioéster interno expuesto. Si no se une a la superficie de algún microorganismo C3b permanece en fase fluida y se combina con una molécula de agua, quedando así su enlace tioéster hidrolizado y el C3b inactivo.

Para su activación, C3 requiere de los Factores B y D y del catión Mg^{++} , todos presentes en el suero normal, luego de la cual produce hidrólisis espontánea de enlaces tioéster, y luego se desencadenan las demás reacciones, siempre bajo el modelo de activación en cascada.

Cuando C3b se une a las membranas de bacterias, hongos y parásitos, los mecanismos de regulación que bloquean la amplificación en el estado de reposo no funcionan, desencadenando la respuesta. Se debe destacar que, el fragmento C3a, por su actividad de anafilotoxina, activa mastocitos y basófilos, induciendo la liberación de mediadores químicos por parte de estas células, lo que potencia la inflamación, y el fragmento C3b generado en la vía clásica, también amplifica la señal, suponiendo este fenómeno un mecanismo de conexión entre ambas vías.

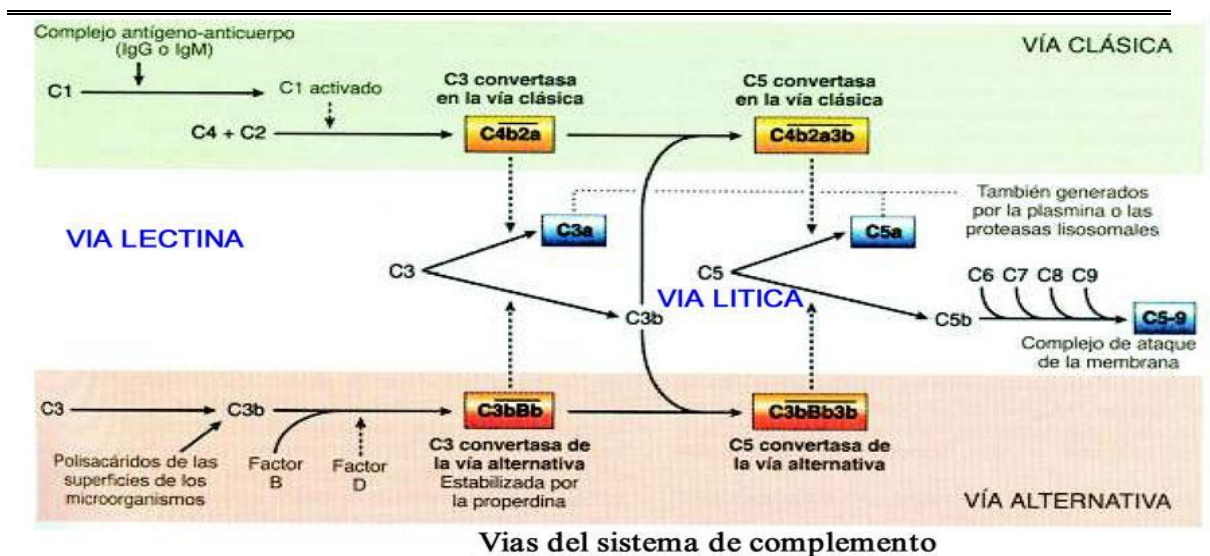
Vía de la lectina.

Esta vía se inicia por el enlace de la lectina unida a la manosa (MBL) sobre la superficie de las bacterias, que contiene polisacáridos ricos en este carbohidrato. El enlace de la lectina al patógeno produce la asociación de dos serinas proteasas, MASP-1 y MASP-2 (proteasas de serina asociadas a MBL), y desde allí las proteínas reguladoras y las actividades biológicas de esta vía son las mismas que las de la vía clásica (figura 13).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

Para su activación, esta vía generalmente no requiere la participación del anticuerpo, aunque últimamente, se ha encontrado activación adicional mediada por complejo antígeno-anticuerpo y moléculas de IgG carentes de residuo terminal de galactosa, como se observa por ejemplo en pacientes con artritis reumatoide. Las evidencias preliminares sugieren que MBL puede tener un receptor sobre las células fagocíticas para ayudar en este proceso.

Figura 13. Vía de activación y desarrollo de la lectina.

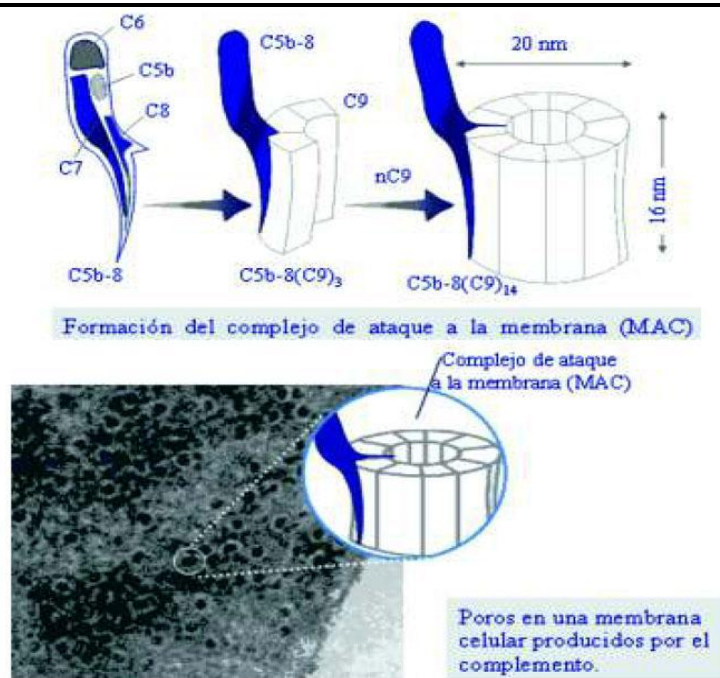


Vía lítica.

Corresponde a las reacciones finales del sistema de complemento. Se inicia cuando las enzimas convertasas de C5 formadas ya sea en la vía clásica, MBL o la alternativa, fijan el factor C5 y lo fragmentan en C5a (anafilotoxina) que pasa al medio fluido y C5b, que se une no covalentemente a C3b. La fracción C5b capta C6 y C7 de la fase fluida, formando un complejo estable C5b67 con actividad quimiotáctica y capacidad de fijación a las membranas, que al unirse a la fracción C8 es citolítico, y adquieren la

capacidad de interactuar con moléculas C9 formando el complejo C5b6789. Las moléculas C9 luego de sufrir cambios conformacionales, potencian y aceleran la penetración de este complejo de ataque a la membrana (MAC), dando origen a la formación de canales que permiten el libre intercambio de sodio y agua con el exterior de la célula, provocando la consiguiente lisis osmótica de la célula atacada, puesto que C9 es estructuralmente homólogo a la perforina, proteína liberada por los linfocitos T citotóxicos y las células NK, y que es también responsable de la formación de poros en la membrana de las células diana (figura 12).

Figura 14. Formación del complejo de ataque a la membrana.



Formación del Complejo de ataque a la membrana (MAC)

El MAC tiene una superficie externa hidrofóbica, que se asocia con la fracción lipídica de la membrana, y un núcleo hidrofílico a través del cual pasan pequeñas moléculas iónicas y agua. El fluido extracelular de la célula se comunica entonces con el

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

intracelular; de tal manera que una vez insertado este complejo en la membrana, no puede mantenerse el equilibrio osmótico ni químico. El agua ingresa a la célula debido a la alta presión osmótica interna, produciendo con ella su lisis. El ensamblaje de C5b-C8 parece formar pequeños canales de membrana que van alargándose y se estabilizan por el ligamiento de múltiples moléculas de C9. Cuando estos canales penetran en la membrana por ejemplo de los eritrocitos es suficiente para destruir a estas células, pero células con maquinaria metabólica más compleja pueden destruir a este complejo (80).

I.B.1. 2. Algunas funciones fundamentales del sistema del complemento.

Acción citolítica.

Una vez puesta en marcha la cascada del complemento, al formarse el complejo de ataque a la membrana se produce la lisis de las células sobre cuyas membranas se ha adosado dicho complejo, puesto que permite la formación de poros. Este efecto se logra por la unión antígeno-anticuerpo (vía clásica) o por la activación causada por las propias células diana (vía alternativa). Todas estas acciones se agrupan bajo la denominación conocida de citotoxicidad dependiente del complemento.

Acción anafilotóxica.

Básicamente ejercida por las fracciones C3a y C5a, unido con receptores de membrana, sobre todo esta última, ocasionando contracción de la musculatura lisa y degranulación de mastocitos y basófilos, con la consiguiente liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas, las mismas que incrementan la permeabilidad vascular, lo cual facilita la afluencia de leucocitos y distintas moléculas al foco inflamatorio.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

Acción quimiotáctica.

Las fracción C5a posee una potente actividad quimiotáctica, que determina la atracción de leucocitos al foco inflamatorio.

Opsonización.

Es la acción facilitadora de la fagocitosis, para ello los macrófagos y neutrófilos presentan en sus membranas receptores capaces de unir la molécula C3b y sus derivados resultantes de la activación del complemento. La fagocitosis de microorganismos dependiente de C3b y iC3b es probablemente el mayor mecanismo de defensa frente a las infecciones bacterianas.

Aclaramiento de inmunocomplejos.

Bajo condiciones normales, se detectan inmunocomplejos solubles circulando en plasma. Estos inmunocomplejos son potencialmente peligrosos, puesto que podrían precipitar en algún tejido y por ende activarían el complemento e iniciarían un foco inflamatorio. Sin embargo, existe un mecanismo fisiológico de aclaramiento de estos inmunocomplejos. Los eritrocitos presentan CR1 en su membrana y mediante este receptor captan a los inmunocomplejos circulantes a través del factor C3b. Cuando estos eritrocitos atraviesan el hígado o el bazo, los macrófagos de estos órganos, mediante sus receptores CR1, CR3 o CR4, unen los inmunocomplejos a través de C3b, o mediante receptores para Fc a través de IgG y los fagocitan. Los eritrocitos quedan libres para captar nuevos inmunocomplejos(81).

La activación del complemento por células cancerígenas.

El complemento es una parte esencial del sistema inmune que participa en la eliminación de células extrañas al organismo. Debido al gran número de alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas a la carcinogénesis, la transformación neoplásica puede incrementar la capacidad de la célula maligna para activar el complemento. Este hecho está sustentado por numerosos estudios clínicos que demuestran una activación del complemento en pacientes con cáncer. Sin embargo, las células malignas suelen desarrollar mecanismos de protección que les hacen resistentes al complemento. A la luz de recientes investigaciones sobre los mecanismos de regulación de la actividad del complemento, el papel de las proteínas inhibidoras, tanto de membrana como solubles, en la protección de las células neoplásicas es cada vez más evidente (82).

1.B.2. Factor H en sujetos sanos.

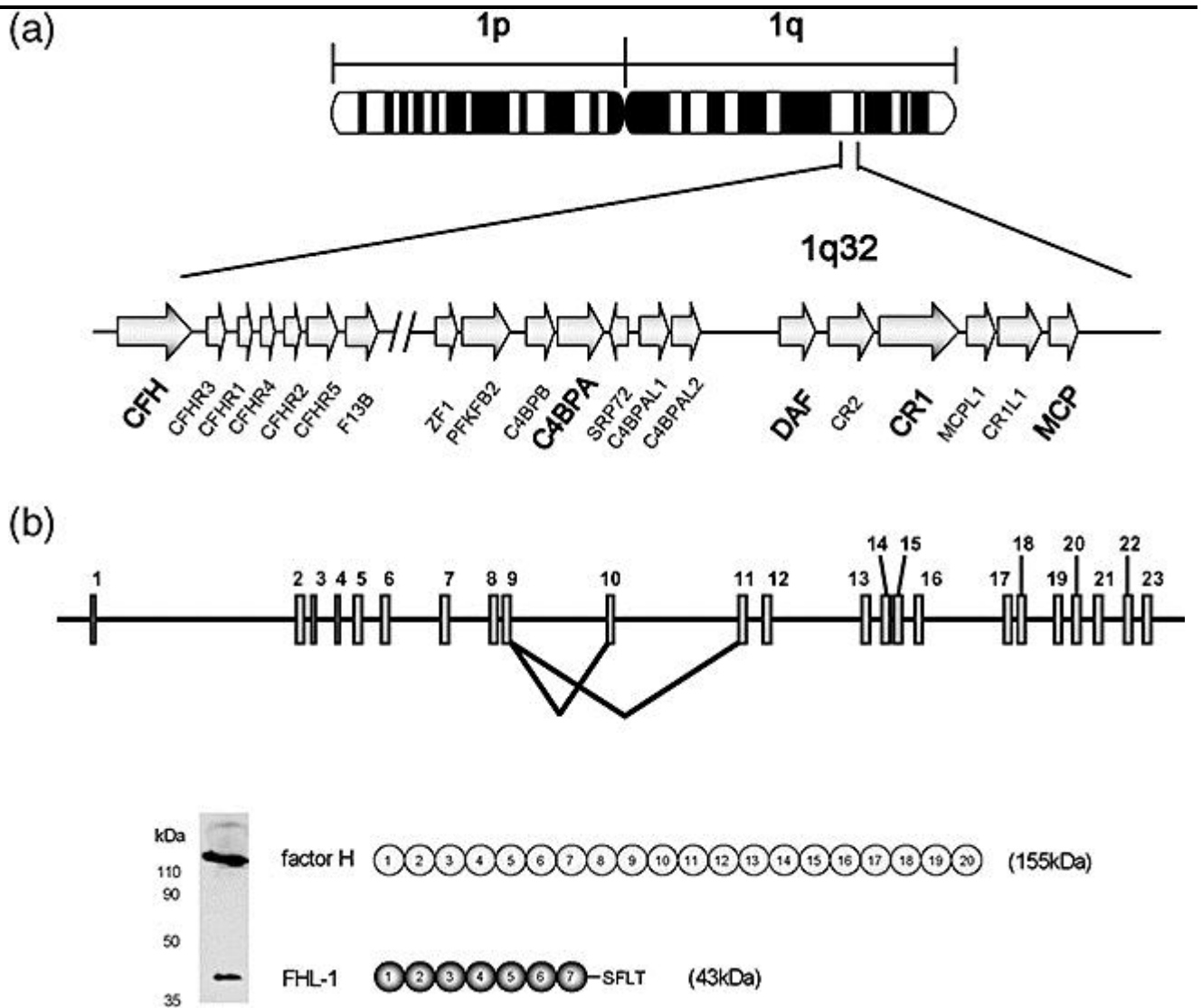
La activación de la cascada del complemento está controlada por distintas proteínas reguladoras, que evitan dicha activación. Además, la vía alternativa se activa espontáneamente, como hemos visto, por lo que requiere mecanismos específicos de protección para evitar los posibles efectos destructivos de un sistema activado no controlado. El factor H es un inhibidor clave de la activación de la vía alternativa (83). Se trata de una glicoproteína de 150 kDa presente en plasma, sintetizada principalmente por el hígado (aunque también por mononucleares, fibroblastos, células endoteliales, células mesangiales, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) (84,85,86) (figura 15). Se compone de 20 dominios repetidos, cada uno con 60

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

aminoácidos (82). Además, existe una segunda proteína, de 42-kDa, denominada factor H-like (FHL-1), que contiene los primeros 7 dominios del factor H con 4 aminoácidos adicionales (87). La función es la misma que la del factor H, desempeñando un papel clave en la regulación del factor C3b, inhibiendo la C3 convertasa. Por otra parte, es necesario como cofactor para la inactivación del C3b por parte del factor I, por lo que el resultado final es la inhibición de la vía alternativa del complemento (81, 83 88, 89).

Otras funciones descritas del factor H están relacionadas con la estimulación de la respuesta neutrofílica (se une a la L-selectina y también a la integrina Mac-1(CD11b/CD18); en relación con los monocitos, los atrae y estimula, induciendo la secreción de interleukina-1 por ellos. Por otra parte, es estimulante de la actividad de la adrenomedulina, molécula vasodilatadora y relacionada con la carcinogénesis, así como puede unirse a la superficie celular de distintos gérmenes, aumentando su patogenicidad al inhibir la vía alternativa (83)

Figura 15. Estructura y localización cromosómica del gen del Factor H. Western blot con anticuerpo monoclonal 35H9, que reconoce factor H y FHL-1 en plasma normal (90).



Recientemente se han investigado otras proteínas de la familia del Factor H (figura 16), relacionadas con distintas funciones que se exponen en la Tabla 10 (91)

Figura 16. Estructura de otras proteínas de la familia del factor H (91).

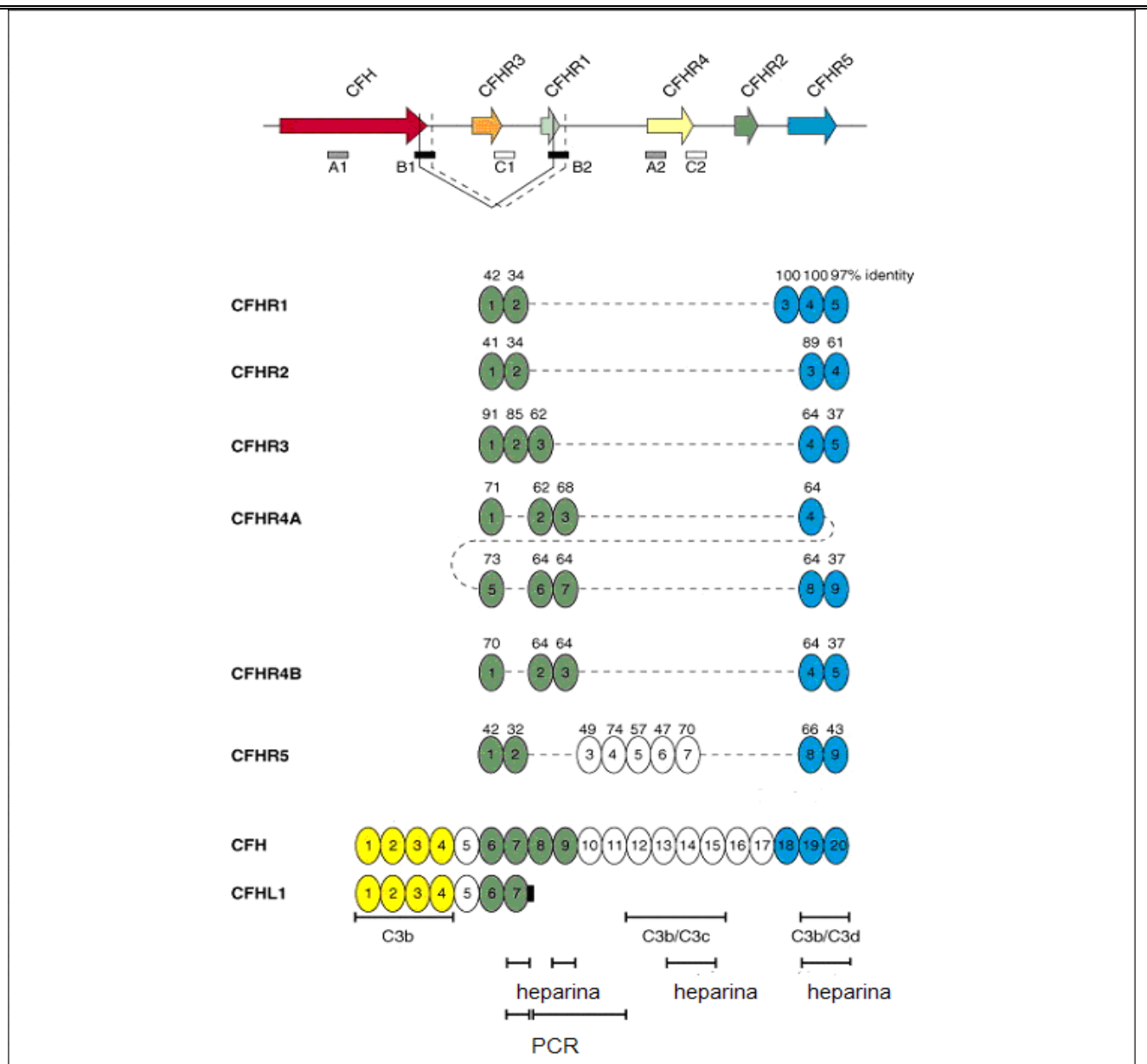


Tabla 10. Familia de proteínas del Factor H y algunas funciones conocidas (91).

| <i>Proteína</i> | <i>Tamaño</i> | <i>Presentación en plasma</i> | <i>Ligandos conocidos</i> | <i>Unión a patógenos</i> | <i>Función</i> |
|-----------------|------------------------------------|---|-------------------------------------|--|---|
| FH | 150 kDa | Glicoproteína, asociada a HDL y LDL | C3b, C3c, C3d, heparina, PCR, otros | Múltiples ligandos microbianos, proteína M | Inhibidor de actividad y adhesión celular |
| FHL1 | 42 kDa | Glicoproteína | C3b, heparina, PCR | Múltiples ligandos microbianos, proteína M | Inhibidor de actividad y adhesión celular |
| CFHR1 | 37 kDa 43 kDa | Isoformas glicosiladas, asociadas con HDL | | Múltiples ligandos microbianos | |
| CFHR2 | 24 kDa 29 kDa | Isoformas glicosiladas y no glicosiladas, asociadas con HDL | | | |
| CFHR3 | 36–50 kDa | | C3b, C3d, heparina | Proteína M | Estimula actividad del Factor H |
| CFHR4 | 42 kDa (CFHR4B) 86 kDa (CFHR4A) | | C3b, C3d | | Estimula actividad del Factor H |
| CFHR5 | 65 kDa | Asociadas con HDL | C3b, heparina, PCR | | Inhibidor del Factor H |

1.B.3. Variaciones del gen de Factor H y su relación con diversas patologías no tumorales.

Algunos estudios recientes han descrito la asociación entre variaciones genéticas del gen del factor H con el síndrome hemolítico-urémico atípico, la degeneración macular

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

relacionada con la edad y la glomerulonefritis membranosa (90). Dichas enfermedades (raras) se relacionan con mutaciones o polimorfismos en el gen del factor H.

1.B.4 Factor H en patología tumoral.

El factor H y el FHL-1 se han evidenciado en numerosas líneas celulares de diferentes cánceres: ginecológicos, neurológicos, urinarios, tumores del área O.R.L., y también en cáncer de pulmón, habiendo demostrado en éstas capacidad para limitar la acción del complemento en sus membranas celulares, contribuyendo en parte probablemente a su resistencia a la respuesta inmune (92, 93, 94, 95, 96, 97). En los últimos años, su determinación ha adquirido incluso relevancia clínica, siendo empleado como marcador para el cáncer de vejiga (98).

1.B.5 Factor H en el cáncer de pulmón.

Ha sido recientemente demostrado el depósito de C3 y C3b en escasa cuantía en las membranas celulares de células cancerosas pulmonares, sin llegar a ser capaces de iniciar la lisis celular (83, 99). Al estar implicado el factor H en la degradación a C3b inactivado, probablemente juega un papel junto con otros reguladores en la capacidad de las células tumorales para eludir la acción lítica del complemento. De hecho, Ajona et al demostraron que al neutralizar el factor H con un anticuerpo específico, se detectan mayores depósitos de fragmentos de C3 en la membrana celular de líneas celulares de cáncer de pulmón.

A pesar de que este aumento produce escaso incremento de la lisis celular mediada por complemento, sin duda interviene en la potenciación de otros mecanismos

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

citotóxicos (macrófagos, linfocitos células NK) así como diferentes mecanismos inflamatorios (83). Además, se ha demostrado que tanto el factor H como el FHL-1 se unen a la adrenomedulina, factor de crecimiento tumoral, estimulando su actividad y facilitando la progresión tumoral (99, 100). Por lo tanto, se puede concluir a la luz de estos datos que el Factor H y el FHL-1 podrían tener relación con la respuesta del organismo frente al cáncer de pulmón, o al menos frente a algunos de sus tipos histológicos.

II. PLANTEAMIENTO. HIPÓTESIS. OBJETIVOS.

II.A PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más prevalentes y la principal causa de muerte por cáncer en los países desarrollados (1). El retraso diagnóstico que suele caracterizar a esta entidad justifica la discordancia entre la presencia de cada vez mayores tratamientos disponibles (quirúrgico, quimioterapia y radioterapia) y la elevada mortalidad (supervivencia global menor del 15% a los 5 años). Así, menos del 20% de los pacientes son diagnosticados en estadio I, que es el que mejores supervivencias muestra (mayores del 50% a los 5 años) (42).

La broncoscopia, especialmente la flexible, es un procedimiento seguro y relativamente accesible para ser llevado a cabo que ha probado su gran utilidad en el diagnóstico y manejo de las enfermedades pulmonares. De hecho, se considera a la broncoscopia la herramienta diagnóstica principal en pacientes con sospecha de carcinoma pulmonar localizado centralmente. Esta eficacia se reduce como hemos visto si los tumores presentan un tamaño pequeño y si se localizan en la periferia. Los procedimientos diagnósticos broncoscópicos incluyen el examen anatomopatológico de las muestras obtenidas por biopsia bronquial, cepillado bronquial y lavado broncoalveolar (BAL). Estos test son menos invasivos que otros métodos que procuran tejido, y conllevan un muy pequeño riesgo de complicaciones. Permite el diagnóstico de hasta el 90% de los tumores visibles endoscópicamente. Lamentablemente su utilidad viene limitada por el hecho de que menos del 50% de los tumores distales (lesiones periféricas) pueden diagnosticarse mediante esta técnica (62).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

En los últimos años, numerosas investigaciones han ido dirigidas a explorar la posibilidad de detectar alteraciones asociadas al cáncer de pulmón, tanto genéticas (mutaciones en distintos oncogenes, anormalidades cuantitativas o cualitativas cromosómicas, etc.) como la sobreexpresión de determinadas proteínas (EGFR, activación de telomerasa, etc.) (42) Es de esperar que estas nuevas aproximaciones terapéuticas puedan ser utilizadas en el futuro para aumentar la sensibilidad del examen citológico en el diagnóstico mediante examen de muestras bronquiales.

En otras estirpes y localizaciones tumorales se han descubierto marcadores diagnósticos nuevos que podrían tener aplicación en el cáncer de pulmón. En el cáncer de vejiga se ha demostrado la utilidad diagnóstica de la determinación de factor H o su análogo factor H like-proteín 1 (FHL-1). El factor H es un inhibidor de la vía alternativa de la activación del complemento, capaz de prevenir su puesta en marcha y mejorar así el desarrollo tumoral in vivo. Como ya ha sido expuesto, su presencia también ha sido confirmada en otro tipo de tumores.

Recientemente se ha comprobado la presencia de niveles elevados de factor H en líneas celulares y también en biopsias de carcinoma no microcítico de pulmón, objetivándose su secreción al medio extracelular (83). La presencia de niveles elevados de factor H o FHL-1 en las secreciones bronquiales de pacientes con cáncer de pulmón podría contribuir a mejorar las actuales herramientas diagnósticas. Si esto se confirmase podría ser el primer paso para conseguir el diagnóstico precoz si se aplicase en forma de screening en grupos de riesgo (fundamentalmente fumadores).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

Para obtener muestras bronquiales suficientemente representativas, el lavado broncoalveolar resulta la forma mínimamente invasiva más eficaz para obtener material tanto celular como acelular. Este material obtenido mediante la instilación de suero en segmentos concretos del árbol bronquial con posterior aspirado del mismo podría relacionarse con la presencia de un tumor no visible endoscópicamente.

A la vista de estos parámetros, en el presente trabajo intentamos establecer el valor de la cuantificación de factor H como marcador de cáncer de pulmón, considerando sus cualidades a nivel de sensibilidad y especificidad diagnósticas. Se cuantificaron otras sustancias como las proteínas totales y la albúmina, para valorar otras sustancias que no se detectan habitualmente y ver si se relacionaban o no con la presencia de cáncer de pulmón y si se correlacionaban con la presencia de factor H. En resumidas cuentas, ver si la elevación del factor H era un específico evento o podrían estar igualmente elevadas otras sustancias proteicas en el LBA. Se determinó además la hemoglobina para valorar si la presencia de proteínas plasmáticas y factor H podría deberse a sangrado endoluminal durante el procedimiento, y no a exudación de dichos marcadores.

Hallados los puntos de corte de interés, se realizó una validación interna utilizando como muestra una serie independiente de pacientes no seleccionados (51 pacientes, de los cuales 25 presentaban cáncer de pulmón conocido y 26 patología pulmonar benigna) proporcionada por otro centro hospitalario (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Alemania, Drs. Schmidt y Witt). En esta muestra se estudió la sensibilidad y especificidad de los valores de corte obtenidos como discriminatorios.

II.B HIPOTESIS.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la cuantificación del factor H podría ser de utilidad como marcador diagnóstico en la detección del cáncer de pulmón, fundamentalmente en aquellos tumores menos accesibles, debido a su localización periférica, a través de la broncoscopia.

II.C. OBJETIVOS.

El *objetivo primario* es:

"Determinar el valor diagnóstico del factor H en el lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón, estableciendo si existen diferencias entre los pacientes que presentan y los que no presentan patología tumoral pulmonar".

Los *objetivos secundarios* son:

1. Determinar si la cuantía del factor H presenta diferencias según el tipo histológico.
2. Valorar si existen diferencias en la cuantía del factor H según la localización central (visibles) o periféricos (no visibles) de los tumores pulmonares.
3. Comparar los niveles de factor H con los de las proteínas totales y la albúmina en los objetivos y contextos anteriores.

III. PACIENTES Y MÉTODOS.

III.A. Tipo de estudio. Diseño.

Se trata de un estudio observacional de cohortes propectivo, multicéntrico (dos centros hospitalarios), en donde se evalúan el factor H y otros marcadores proteicos (albúmina, proteínas totales) en lavado broncoalveolar y su capacidad de detección del cancer de pulmón.

El estudio se ha realizado en dos centros hospitalarios, la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona, España) y el Hospital Nuestra Señora del Prado, en Talavera de la Reina (Toledo, España). Los pacientes del estudio fueron incluidos prospectivamente, de forma secuencial, según fueron citados para la realización de una broncoscopia.

III.B. Población de estudio.

Se compone de todos aquellos pacientes procedentes de los dos centros hospitalarios que participan en el presente estudio (Clínica Universitaria de Navarra y el Hospital Nuestra Señora del Prado) y que tras ser inicialmente evaluados, se consideró que presentaban datos sugerentes de patología pulmonar y en los que se indicó la realización de un broncoscopia diagnóstica.

En el presente estudio por lo tanto el criterio de inclusión es la realización de una broncoscopia diagnóstica por sospecha de patología pulmonar.

III.C. Procedimiento broncoscópico y obtención de muestras.

A la llegada del paciente, se comprobó la ausencia de contraindicaciones para la realización de la prueba broncoscópica. La premedicación se realizó con midazolam

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

intravenoso, en dosis de 2-5 mg. La broncoscopia fue practicada bajo anestesia local con lidocaína al 2% utilizando un broncoscopio flexible (Olympus Exera BF 240).

Tras una inspección sistemática de ambos hemisistemas bronquiales, se realizó el lavado broncoalveolar mediante instilación bronquial de 4 alícuotas de 40 ml cada una de suero fisiológico, aspirándolo suavemente después mediante aspiración con jeringa. En pacientes con enfermedad difusa (broncopatía crónica, enfermedad intersticial difusa, etc.) se realizó el lavado broncoalveolar en el lóbulo medio o llingula, intentando escoger aquél que presentaba una mayor afectación radiológica. En los casos, tumorales o no, en que la patología estaba localizada, el lavado broncoalveolar fue practicado en los bronquios del área afecta o en las zonas más cercanas cuando no fue posible.

Las alícuotas obtenidas se mezclaron y se dividieron en dos fracciones: una para la realización de un examen citológico y otra para la determinación de marcadores.

III.D. Examen citológico convencional.

Las muestras citológicas fueron tratadas según procedimientos de rutina, fijándolas con solución de Saccomanno y tiñéndolas posteriormente con Papanicolau. Fueron evaluadas por un citólogo experto como positivas o negativas para células tumorales. El diagnóstico histológico y la clasificación de las muestras se realizaron siguiendo los criterios de la OMS, obteniéndose en todos los casos diagnóstico histológico, bien en el procedimiento broncoscópico o bien mediante otras pruebas ulteriores.

III.E. Mediciones de marcadores.

Las determinaciones de los marcadores se realizaron en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra.

Los marcadores determinados en lavado broncoalveolar fueron: albúmina, proteínas totales, hemoglobina y factor H. Las alícuotas del lavado broncoalveolar destinadas a determinaciones de marcadores moleculares fueron inicialmente congeladas a -80°C hasta el momento del análisis. Las determinaciones cuantitativas de albúmina y hemoglobina se realizaron a través de kits comerciales ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Immun Diagnostik, Bensheim, Alemania). Previamente las muestras eran diluídas en tampón fosfato salino (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro sódico, pH 7.4), a dilución 1:1000 para la cuantificación de albúmina y a 1:10 para la hemoglobina. Las proteínas totales se determinaron utilizando el kit de proteína BCA (Pierce, Rockford, USA), con BSA como proteína de referencia. Para la cuantificación de factor H, se utilizó una placa de poliestireno de 96 pocillos (Corning Inc, NY, USA) recubierta con 50 ng por pocillo de anticuerpos monoclonales anti factor H, en 50 ml de bicarbonato sódico 50 mM (pH 8.3) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales anti factor H se obtuvieron de hibridoma de ratón OX-24 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Posteriormente, la placa se mantuvo toda la noche a 4°C con solución salina tamponada (salino tamponado Tris, 25 mM Tris, 150 mM ClNa, pH 7.4) con 1% BSA y 0.1% Tween-20. Tras lavar, 50 ml de muestra a estudio (diluída 1:20 y 1:40) o muestras standard (en rango

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

de 1.5 a 400 ng/ml) se añadieron e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Para preparar los standards, se utilizó factor H (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) diluído en salino tamponado Tris. Después de lavar, se añadieron 100 ml de anticuerpo anti-factor H de conejo (dilución 1:1000, Serotec, Raleigh, USA) y tras 30 minutos a temperatura ambiente la placa estaba preparada, utilizando anticuerpo anticonejo unido a peroxidasa (1:2000) y OPD. La placa se leyó a 450 nm.

III.F. Variables de estudio.

Las variables recogidas y sus formatos de medición son:

*** Sociodemográficas:**

- *Edad*: variable cuantitativa (en años)
- *Género*: variable binaria (hombre, mujer).

*** Antecedente personal:**

- *Fumador*: variable binaria (sí, no)

*** Tipo de enfermedad pulmonar.** Variable categórica.

- *Grupo II*: pacientes tumorales con citología positiva.
- *Grupo III*: pacientes tumorales con citología negativa. De ellos:

III.A: localización central.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

III.B: localización periférica.

* ***Tipos histológicos del cancer localizados en el pulmón:*** variable categórica (carcinomas de células pequeñas, carcinoma escamoso, adenocarcinoma, tumor carcinoide, carcinoma de células grandes, carcinomas metastásicos de otro origen, carcinoma epidermoide, carcinoma bronquioloalveolar).

* ***Marcadores en líquido broncoalveolar:***

- *Albumina:* variable cuantitativa (en µg/ml).

- *Proteínas:* variable cuantitativa (en µg/ml).

- *Hemoglobina:* variable cuantitativa (en µg/ml).

- *Factor H del complemento:* variable cuantitativa (en µg/ml).

Tras alcanzar el diagnóstico, que en los casos tumorales fue siempre de certeza con definición histológica, los pacientes fueron divididos para su estudio en cuatro grupos:

* Grupo I: Pacientes sin patología maligna tumoral.

* Grupo II: Pacientes con tumores pulmonares malignos y citología positiva.

* Grupo III: Pacientes en los cuales no se identificó citología tumoral, divididos a su vez en:

III A: Pacientes con citología negativa y tumores centrales endoscópicamente visibles

III B: Pacientes con citología negativa y tumores distales no visibles endoscópicamente

Se compararon los pacientes con o sin patología tumoral maligna, intentando determinar si existían diferencias entre los marcadores bioquímicos (con especial relevancia en el caso del factor H), y luego si existen diferencias entre grupos o tipos histológicos tumorales o con respecto a su localización central o periférica en el árbol bronquial según criterios broncoscópicas.

III.G. Recogida de datos.

Todos los datos se recogieron con un cuestionario. Primero se añadieron datos de filiación y datos clínicos en el cuestionario, y posteriormente se añadieron los datos procedentes de los resultados anatomopatológicos y valores de marcadores en líquido broncoalveolar. Cada cuestionario fue recogido de forma independiente en cada centro hospitalario, y posteriormente se unieron en un archivo único para su posterior procesamiento de datos.

III.H. Análisis estadístico.

Para la **estadística descriptiva**, los datos categóricos fueron descritos mediante el valor absoluto y el porcentaje; los datos cuantitativos mediante la media \pm desviación estándar (SD).

Para **comparaciones analíticas** entre variables categóricas utilizamos la prueba de chi cuadrado; en algún momento, si no se cumplen las condiciones de aplicación de

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

aquella utilizo la aproximación exacta de Fisher. Para realizar comparaciones entre dos grupos cuantitativos utilizamos el test de la U de Mann-Whitney. Para comparaciones entre más de dos grupos utilizamos el análisis de la varianza (ANOVA).

La **correlación** entre los datos cuantitativos se realizó mediante una correlación de los rangos de Spearman. Se da su valor (r) y su significación.

Para determinar valores de sensibilidad y especificidad utilizamos las **curvas ROC** (*Receiver Operating Characteristic*); se fijó una sensibilidad de al menos el 80% como punto de corte.

Se considera significativo todo valor de $p < 0,05$.

El software estadístico utilizado para el manejo de los datos fue el paquete informático SPSS® 15.0 para Windows® (IBM® Corporation, Nueva York, Estados Unidos).

III.I. Aspectos ético-legales.

El protocolo de estudio fue presentado y aprobado por los Comités Éticos de ambos centros.

Cada paciente incluido en el registro fue informado y firmó un consentimiento de aceptación de su inclusión en el estudio, así como las peculiaridades del mismo (Apéndice 1). Siempre se les solicito su consentimiento para que sus datos fueran incluidos en este registro y que fueran utilizados para posteriores investigaciones siempre con la garantía del principio de confidencialidad.

IV. RESULTADOS.

IV.A. ESTUDIO DESCRIPTIVO.

Setenta y ocho pacientes fueron sometidos a broncoscopia diagnóstica durante el periodo de reclutamiento.

Los pacientes fueron divididos para su estudio en 4 grupos: 22 pacientes fueron incluidos en el grupo I (pacientes no tumorales), 18 pacientes en el grupo II (pacientes tumorales con citología positiva), 38 pacientes en el grupo III (de los cuales 18 en el III A, pacientes tumorales con citología negativa y localización central y 20 pacientes en el III B, pacientes tumorales con citología negativa y localización periférica).

El **grupo I** incluía a 22 pacientes (tabla 11)

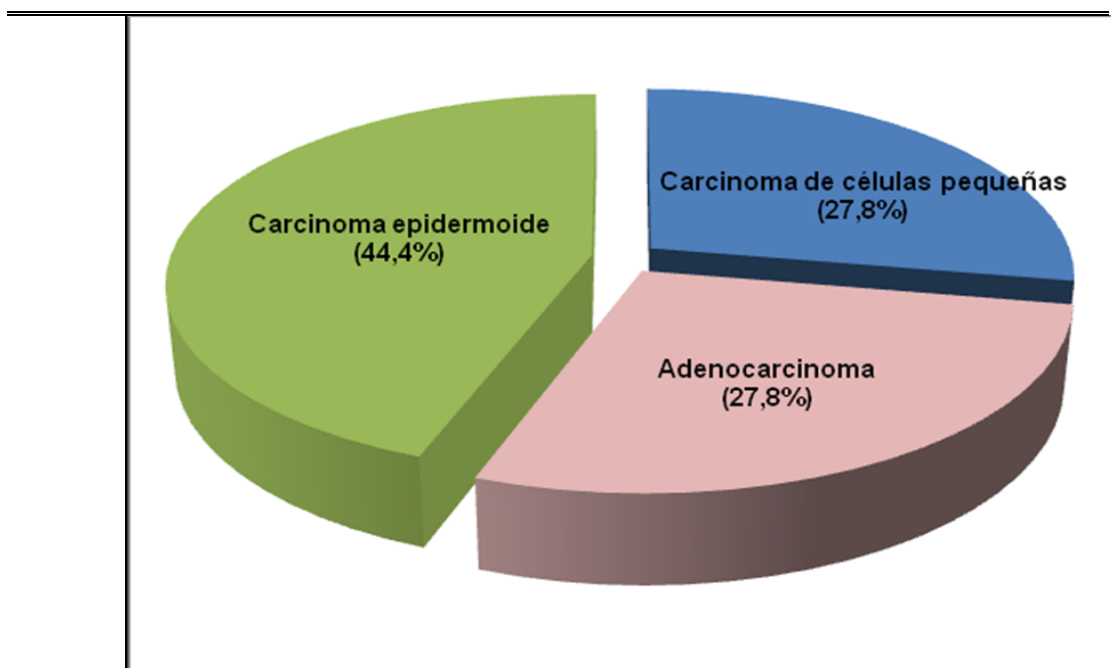
Tabla 11. Componentes patológicos del grupo I.

| Tipo de patología | Número de casos | Porcentaje |
|---|-----------------|------------|
| Neumonía | 4 | 18,2% |
| Enfermedad pulmonar intersticial difusa | 3 | 13,6% |
| Sarcoidosis | 3 | 13,6% |
| Hemoptisis por bronquiectasias | 3 | 13,6% |
| Aspiración cuerpo extraño | 2 | 9,1% |
| Tos crónica a estudio | 2 | 9,1% |
| Nódulos benignos indeterminados | 2 | 9,1% |
| Hamartoma | 1 | 4,5% |
| Bronquiolitis | 1 | 4,5% |
| Síndrome hepato-pulmonar | 1 | 4,5% |

22 casos

En el **grupo II** fueron incluidos 18 pacientes. Los tipos histológicos fueron: carcinoma de células pequeñas (5 casos), carcinoma epidermoide (8 casos) y adenocarcinoma (5 casos) (figura 20).

Figura 20. Tipos histológicos en el grupo II.



En el **grupo IIIA** se incluyeron 18 pacientes. Los tipos histológicos fueron: carcinomas de células pequeñas (3 casos), carcinoma escamoso (5 casos), adenocarcinoma (4 casos), tumor carcinoide (1 caso), carcinoma de células grandes (1 caso), carcinomas metastásicos de otro origen (4 casos). Estos últimos tenían su origen en el ovario, glándula parótida, recto y faringe. En la figura 21 se expone la frecuencia de cada uno.

El **grupo IIIB** incluyó a 20 pacientes. Los tipos histológicos fueron: carcinoma epidermoide (11 casos), adenocarcinoma (3 casos), carcinoma bronquioloalveolar (1 caso), tumor carcinoide (1 caso), carcinoma de célula grande (3 casos) y adenocarcinoma indiferenciado (1 caso). En la figura 22 se representa su contribución relativa al grupo.

Figura 21. Tipos histológicos y porcentajes de los tumores del grupo IIIA.

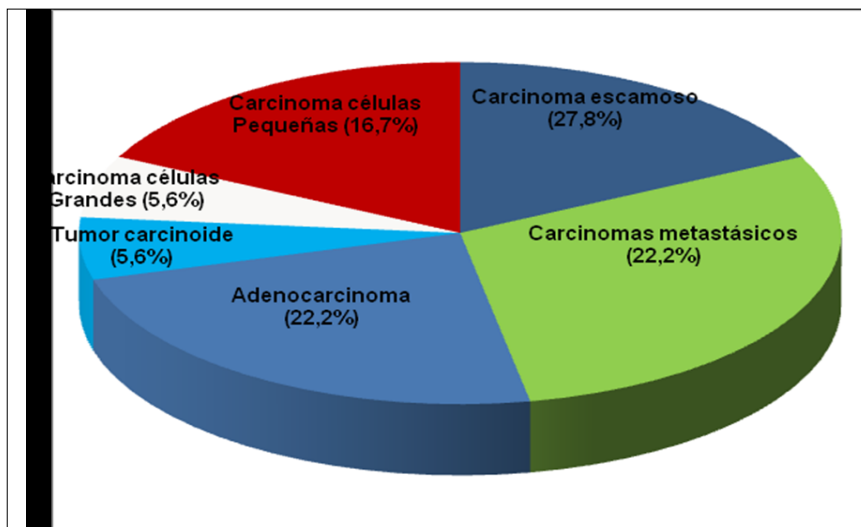
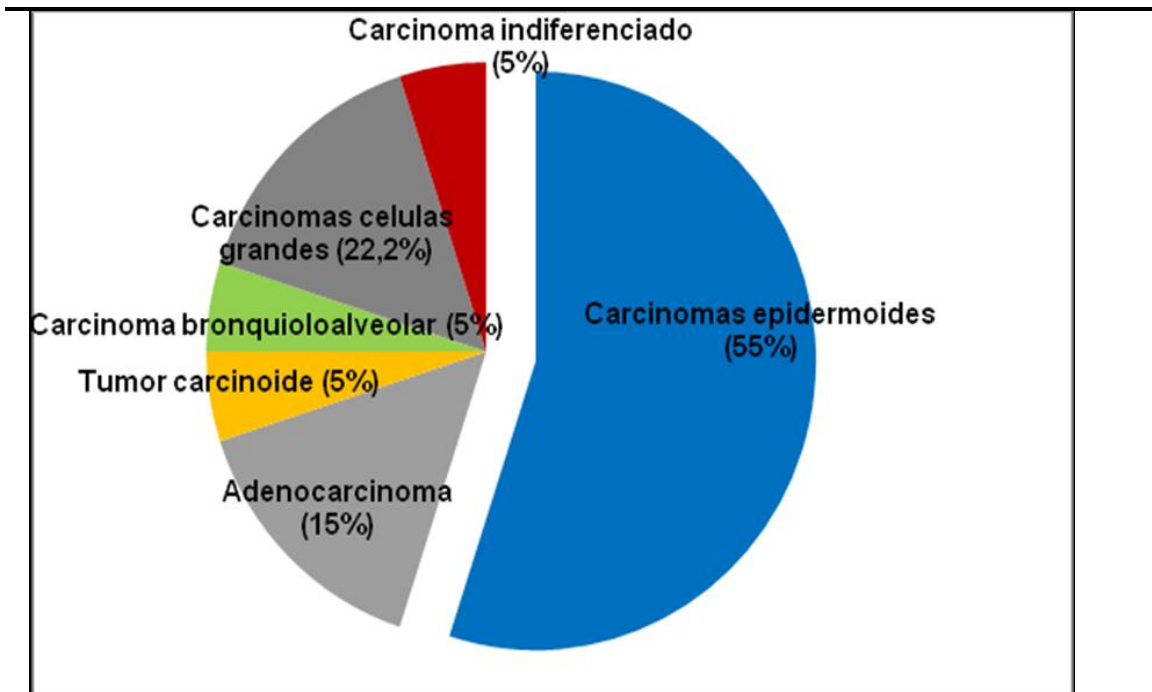


Figura 22. Porcentaje relativo de los tipos histológicos en el grupo IIIB.



IV.B. COMPARACIONES ENTRE GRUPOS.

En la tabla 12 se recogen las características basales de cada grupo, haciendo referencia a la edad, género y tabaquismo. Si comparamos el grupo I con respecto a los otros tres juntos observamos que existe una significación estadística con respecto a una menor edad ($p < 0,05$), una menor frecuencia de género masculino ($p < 0,01$) y un menor porcentaje de fumadores ($p < 0,01$) (tabla 12).

Tabla 12. Características de los grupos de estudio.

| GRUPO | EDAD | VARONES | FUMADORES |
|--------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| (n) | (media±DS; rango) | (%) | (%) |
| I (22)* | 58,2 ± 14,9; 30-82 | 14 (63,6%) | 11 (50%) |
| II (18) | 61,0 ± 12,5; 38-83 | 13 (72,2%) | 15 (83,3%) |
| IIIA (18) | 60,4 ± 11,3; 39-79 | 14 (77,8%) | 13 (76,5%) [†] |
| IIIB (20) | 63,7 ± 10,0; 45-81 | 16 (80%) | 16 (84,2%) [†] |

[†] No estaba recogida la historia de tabaquismo en un paciente de cada grupo.

* Significación estadística con respecto a los otros grupos: p< 0,05 en la edad; p<0,01 en sexo y hábito tabáquico.

Se cuantificó la albumina, las proteínas, la hemoglobina y el factor H del complemento en líquido broncoalveolar en todos los pacientes. La tabla 13 muestra el resumen del análisis comparando el grupo I con el resto y la tabla 14 el análisis individualizado para cada grupo.

Tabla 13. Cuantificación de los marcadores moleculares del grupo I con respecto a los demás.

| GRUPO | FACTOR H | ALBÚMINA | PROTEÍNAS TOTALES |
|--------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| I | 1,17 ± 1,50* | 37,2 ± 56,7 ^{&} | 468 ± 589 ^{&} |
| II+IIIA+IIIB | 2,32 ± 2,08 | 221,8 ± 351,1 | 1593 ± 2021 |

* p< 0,05 entre el grupo I y el resto; [&] p<0,01 entre el grupo I y el resto.

Todas las concentraciones (Factor H, albúmina, y proteínas totales) en µg/ml.

Tabla 14. Cuantificación de los marcadores moleculares en cada grupo.

| GRUPO | FACTOR H | ALBÚMINA | PROTEÍNAS TOTALES |
|--------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| I | 1,17 ± 1,50 | 37,2 ± 56,7 | 468 ± 589 |
| II | 2,61 ± 1,8 ^{&} | 262,7 ± 451,6 ^{&} | 2152 ± 3218 ^{&} |
| IIIA | 2,38 ± 2,30 | 126,0 ± 274,4 | 977 ± 1154 |
| IIIB | 2,15 ± 2,52 | 221,9 ± 432,4 | 1305 ± 2215 |

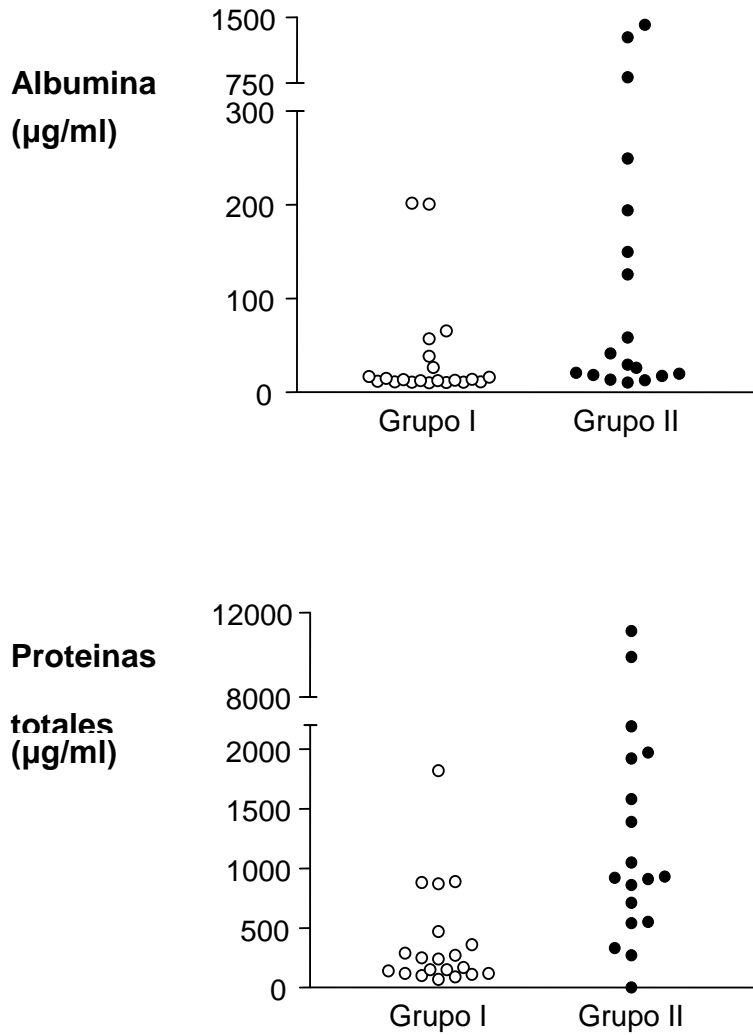
* p< 0,01 con respecto al grupo I; * p< 0,05 con respecto al grupo I.

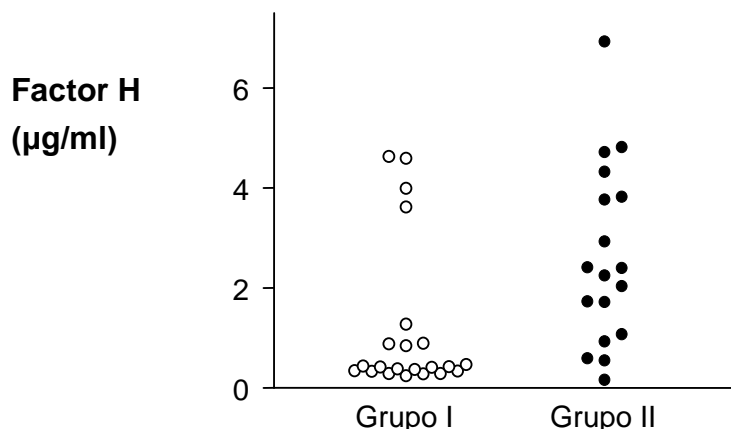
Todas las concentraciones (Factor H, albúmina, y proteínas totales) en µg/ml.

Si comparamos los valores de las tres variables, observamos una diferencia estadísticamente significativa en la determinación del factor H, albúmina y proteínas totales en el lavado broncoalveolar.

En relación a la utilidad de estos marcadores para el diagnóstico de cáncer de pulmón, comparamos los dos primeros grupos: el I (pacientes sin cáncer de pulmón) y el II (pacientes en los cuales el examen citológico positivo confirmó la presencia de células malignas). Si observamos la tabla 14 encontramos que las mayores diferencias se producen entre el grupo I (pacientes sin patología tumoral maligna) y el grupo II (pacientes con citología del BAL revelando células malignas). Así el factor H en el BAL de pacientes con cáncer tienen unos niveles significativamente mayores que los no cancerosos (p =0,01) (Figura 25).

Figura 25. Concentración de albúmina, proteínas totales y factor H del complemento en el LBA de pacientes del grupo I y II.





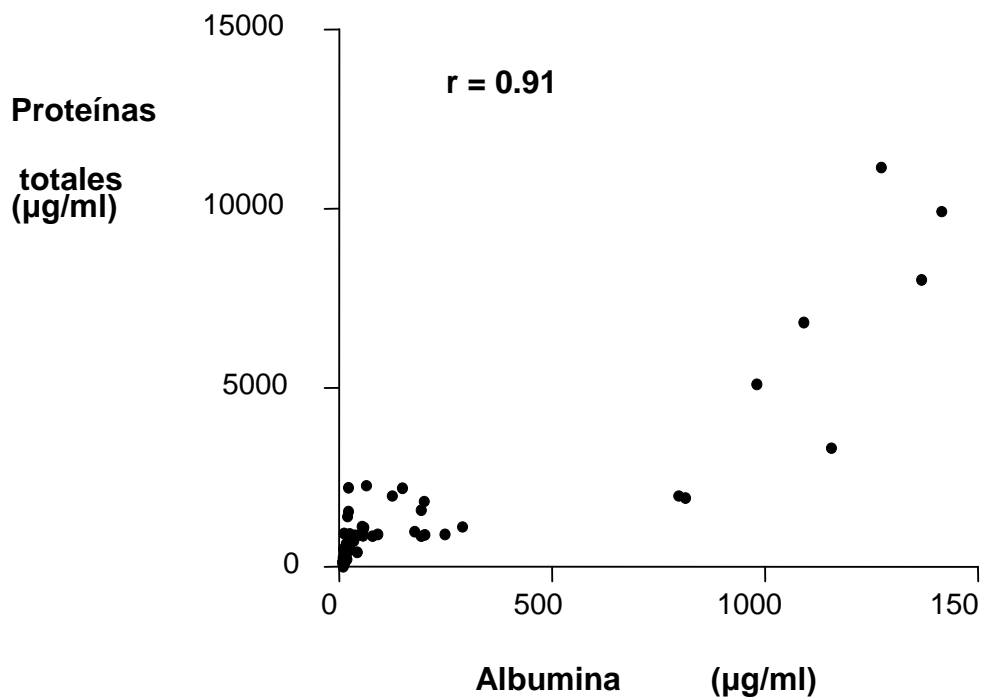
No existen diferencias significativas entre los diferentes tipos histológicos (solo una tendencia hacia una mayor concentración del factor H en pacientes con carcinoma escamoso). Incluso en el LBA de los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, los pacientes presentaron unos niveles altos de factor H ($2,8 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$).

En la figura 25 se observa la comparación del grupo I y II, comparando la albúmina, las proteínas totales y el factor H. Así observamos que existen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre estos dos grupos no solo en el factor H, sino también en las proteínas totales y la albúmina.

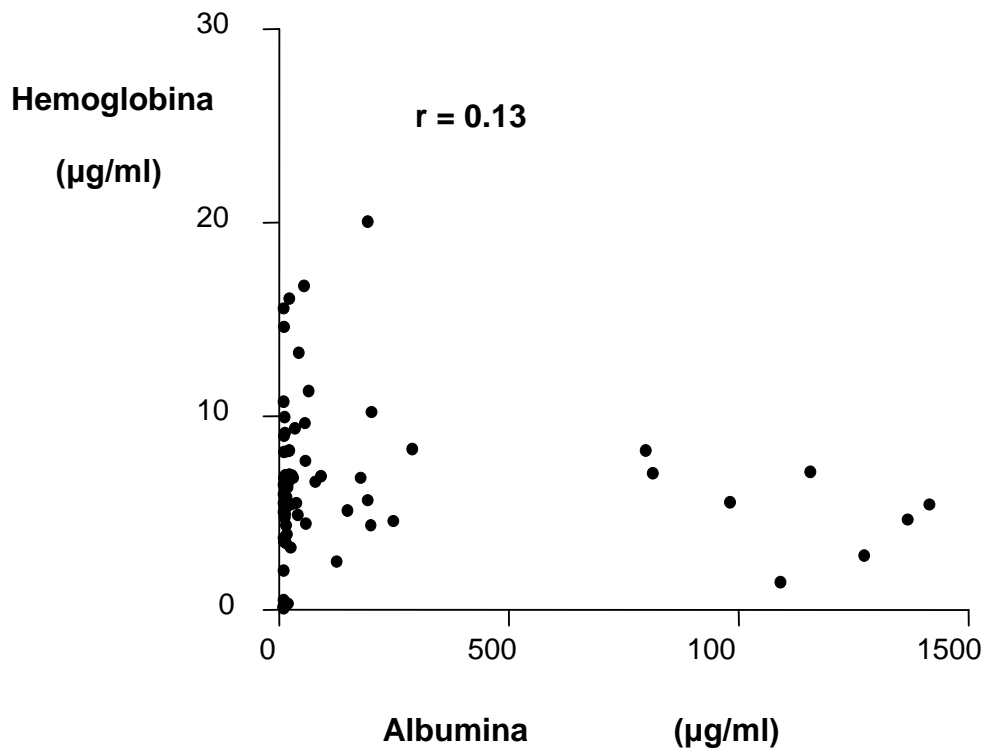
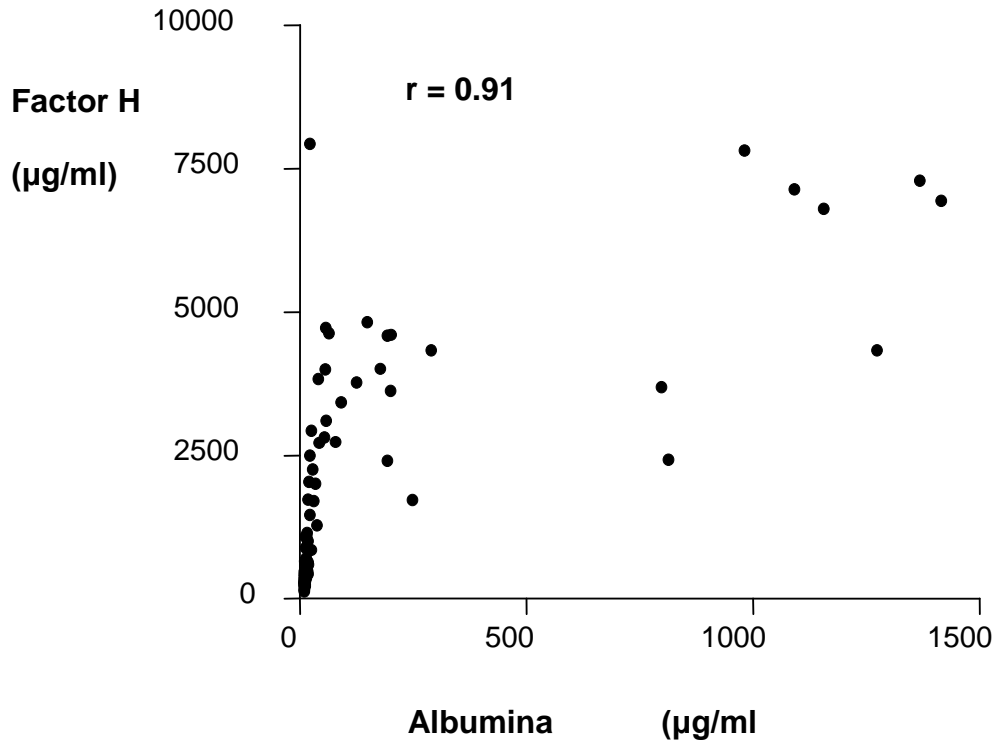
Se observa una correlación significativa entre los niveles de factor H y el contenido de proteínas totales ($r = 0,889$; $p < 0,001$). Examinamos la concentración de albúmina en el LBA de los pacientes en el grupo I y en el grupo II. Había una concentración significativamente mayor de albúmina en el grupo canceroso que en el grupo control ($p < 0,01$). La concentración de albúmina estaba altamente correlacionada con la concentración de factor H ($r = 0,912$; $p < 0,001$).

Con respecto a los niveles de hemoglobina en el LBA, eran similares entre el grupo control y el grupo de pacientes con cáncer. Además, no existía correlación entre el factor H y la hemoglobina ($r=0,210$; $p=0,219$). En la figura 26 se muestran las correlaciones entre la albúmina y el resto de marcadores, así como con la hemoglobina.

Figura 26. Correlación entre la albúmina y los niveles de proteínas totales, factor H del complemento y hemoglobina. El coeficiente de correlación de Spearman es reseñado en cada relación.



Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón



Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en factor H, proteínas totales y niveles de albúmina entre fumadores y no fumadores dentro del grupo control. Tampoco existía ninguna correlación entre estos biomarcadores y otros parámetros tales como género, tamaño tumoral, intensidad del hábito tabáquico (paquetes/año) o localización de la neoplasia.

IV.C. EVALUACIÓN DEL FACTOR H COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA.

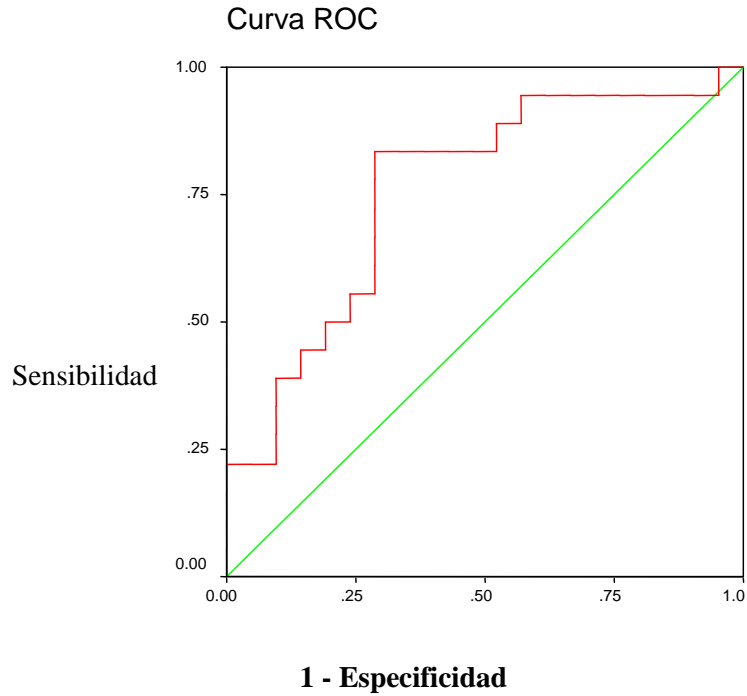
Se generaron curvas ROC para cada biomarcador para diferenciar entre los grupos I y II (figura 27).

Las áreas bajo la curva son:

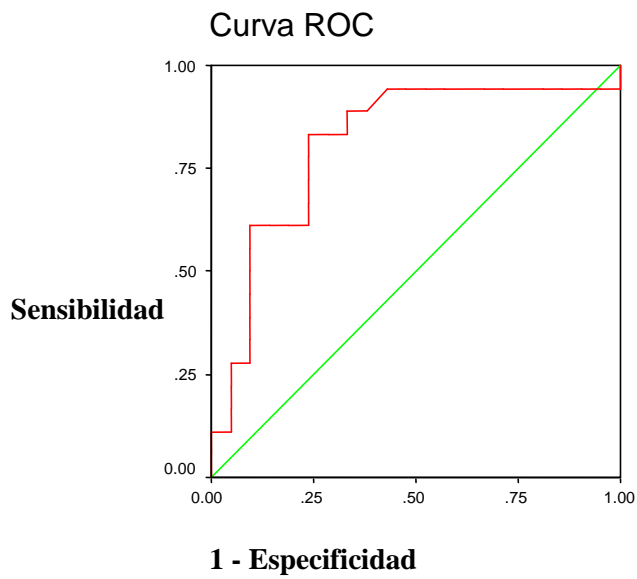
- Factor H: 0.79 (IC 95%, 0.63–0.94).
- Proteínas totales: 0.81 (IC 95%, 0.67–0.96).
- Albúmina: 0.76 (IC 95%, 0.60–0.91).

Figura 27. Curvas ROC para el factor H, albúmina y proteínas totales en el LBA de los pacientes en el grupo I y en el grupo II.

Albúmina

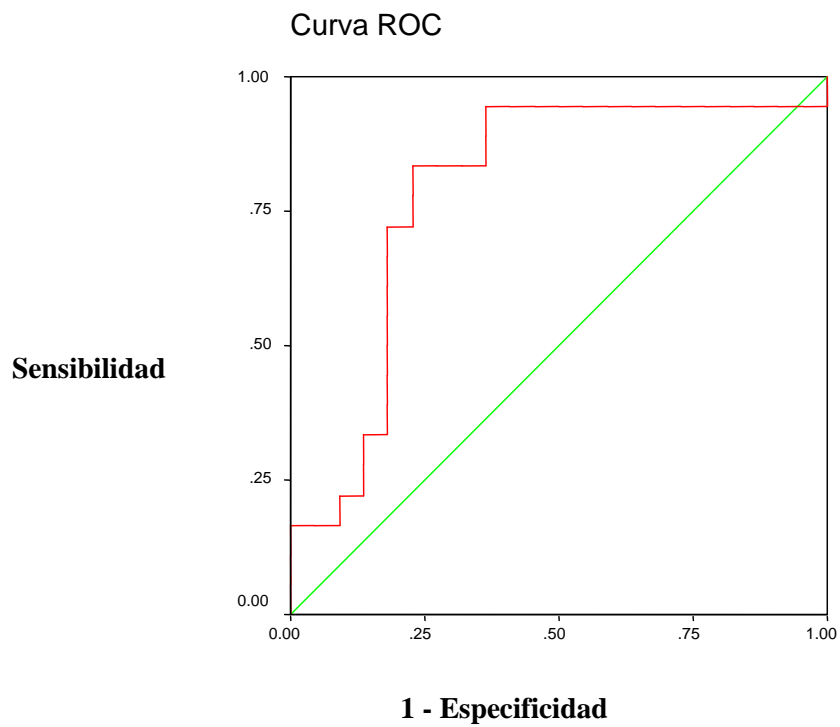


Proteínas totales



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Factor H



Los puntos de corte eran establecidos en orden a proporcionar una sensibilidad de al menos el 80% (Tabla 15). Utilizando estos puntos de corte, cinco falsos positivos comunes a los tres biomarcadores eran obtenidos de los pacientes con hamartoma, bronquiectasias, neumonía, sarcoidosis y enfermedad pulmonar intersticial difusa. En el caso de la cuantificación de albúmina, un paciente con hemoptisis en relación con

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

bronquiectasias fue también mal clasificado como positivo. Casos de falso negativo fueron un adenocarcinoma y dos carcinomas de células escamosas.

Tabla 15. Sensibilidad y especificidad de los marcadores moleculares.

| Marcadores | Punto de corte (µg/ml) | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Factor H | 1,0 | 82 | 77 |
| Proteínas totales | 500 | 82 | 71 |
| Albúmina | 18 | 83 | 71 |

Una vez establecido el punto de corte para la albúmina, las proteínas totales y el factor H del complemento, evaluamos si la cuantificación de estos marcadores en el LBA puede complementar la citología convencional en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Para este supuesto, utilizamos los pacientes en los cuales el examen citológico de su LBA fue insuficiente para diagnosticar la malignidad. Estos pacientes a su vez eran divididos en dos grupos: pacientes con tumores localizados centralmente, siendo visibles por el método de la broncoscopia en el momento del lavado (grupo IIIA) y pacientes con tumores periféricos no visibles endoscópicamente (grupo IIIB). Utilizamos el punto de corte previamente establecido (tabla 15). En el grupo IIIA, el punto de corte utilizado con la cuantificación de la albúmina y el factor H era capaz de clasificar como positivos 12 de los 18 casos (66,7%), y 11 de los 18 casos con la cuantificación de las proteínas totales (61,1%) (figura 28). Así, el test fue positivo en más del 65% de falsos negativos determinados por la citología de los tumores localizados centralmente.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

En el grupo IIIB, un diagnóstico de malignidad se establece en el 55% de los casos (11/20) mediante la determinación de albúmina o proteínas totales, y un 45% (9/20) con factor H (figura 29). Así, la cuantificación de estos marcadores moleculares en tumores distales, reduce la tasa de falsos negativos aproximadamente a la mitad.

Figura 28. Concentración de albúmina, proteínas totales y factor H en grupo IIIA. El punto de corte para cada marcador está indicado.

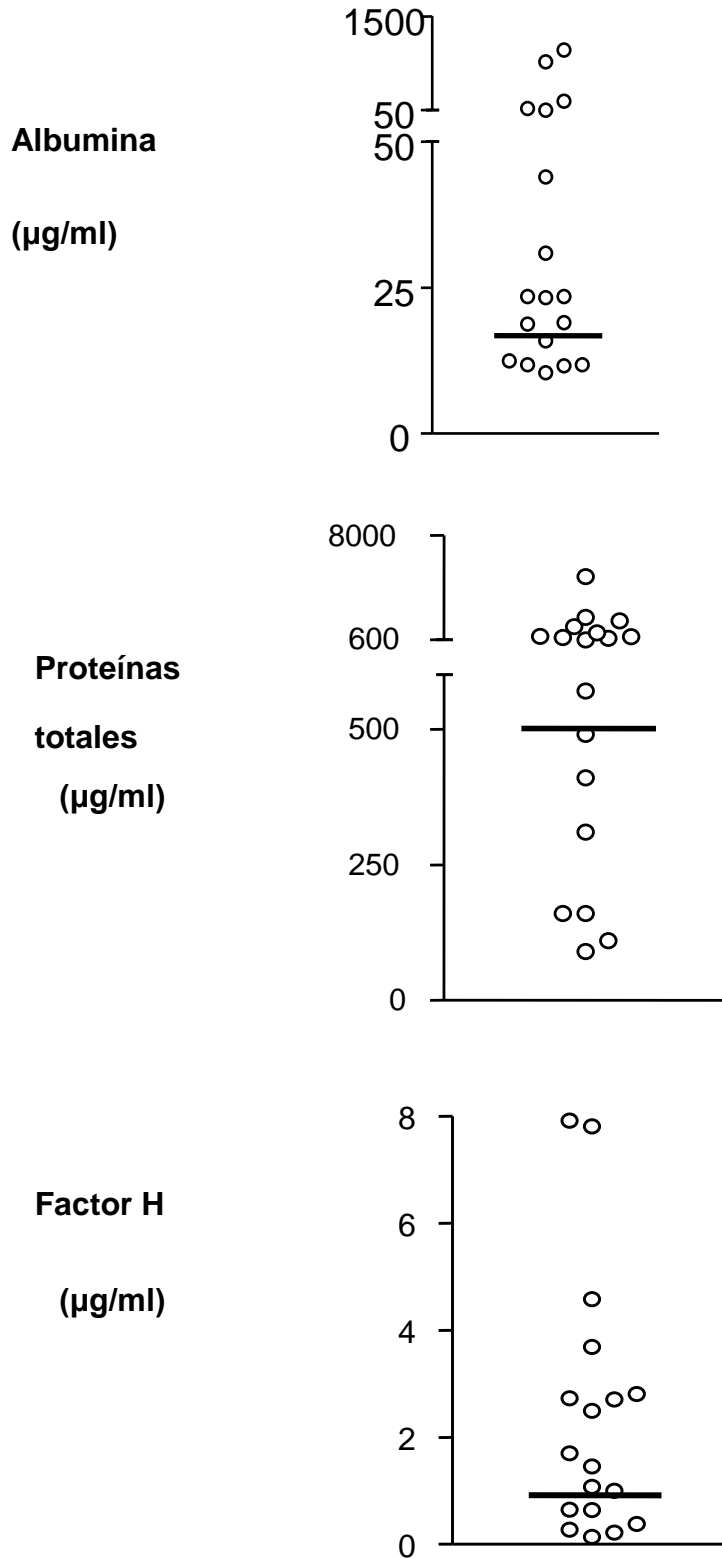
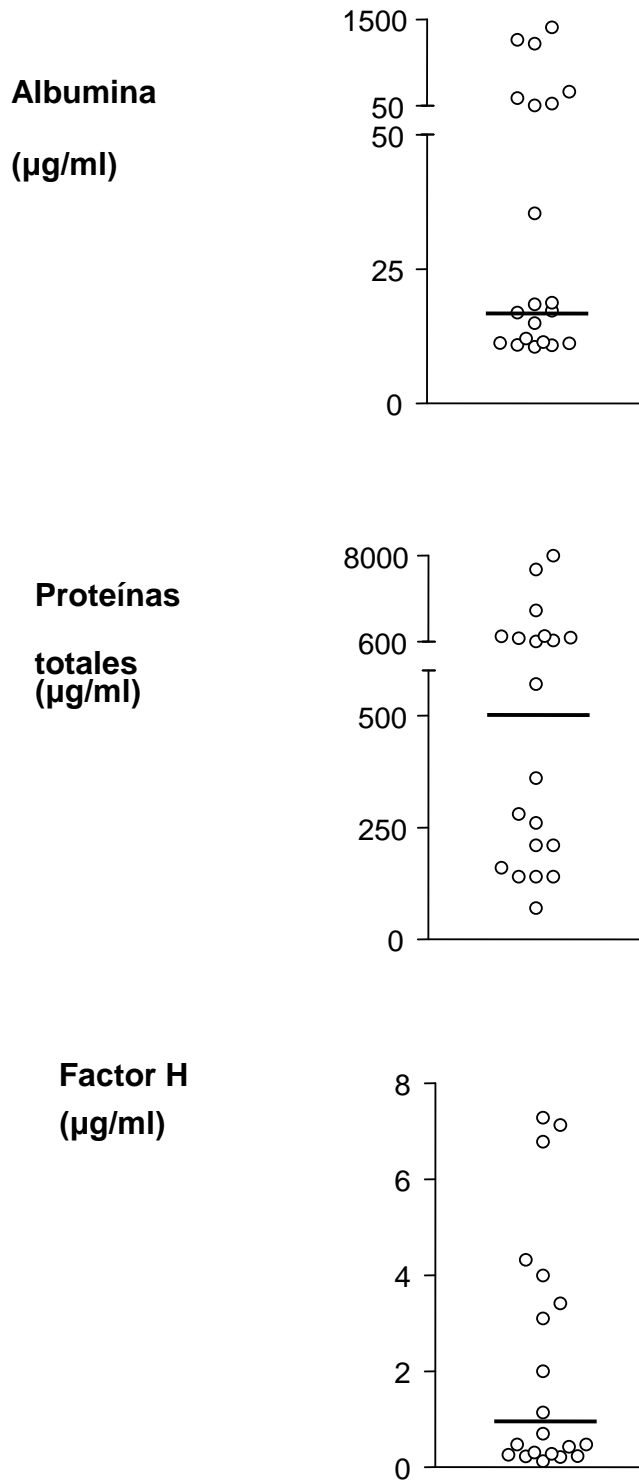


Figura 29. Concentración de albúmina, proteínas totales y factor H del complemento en grupo IIIB. El punto de corte para cada marcador está indicado.



IV.D. VALIDACIÓN INTERNA.

Finalmente, se hizo una validación interna. Para ello el valor diagnóstico de la cuantificación de proteínas plasmáticas fue valorado en una serie independiente de pacientes no seleccionados con cáncer de pulmón (n=25) y pacientes con enfermedad pulmonar benigna (n=26). En esta validación (figuras 30 y 31), el contenido de factor H y proteínas totales eran determinados. Ambos biomarcadores estaban significativamente elevados en el LBA de los pacientes con cáncer de pulmón. Los niveles de factor H eran $2,65 \pm 2,20$ $\mu\text{g/ml}$ en muestras provenientes de los pacientes con cáncer de pulmón y $0,41 \pm 0,46$ $\mu\text{g/ml}$ en la muestra control ($p < 0.001$). El contenido total de proteínas fue 875 ± 590 $\mu\text{g/ml}$ en las muestras tumorales y 297 ± 399 $\mu\text{g/ml}$ en las muestras control ($p < 0,001$). Las curvas ROC fueron también generadas. El área bajo la curva para la concentración de factor H fue de 0,86 (IC 95%, 0,75-0,96) y para el contenido total de proteínas el 0,82 (IC 95%, 0,70-0,93). Se fijó un valor de punto de corte para el factor H en 0,65 $\mu\text{g/ml}$, conduciendo a una sensibilidad del 80% y una especificidad del 81%. Un contenido proteico con un punto de corte fijado en 350 $\mu\text{g/ml}$ determinó una sensibilidad del 76% y una especificidad del 73%.

Figura 30. Validación interna.

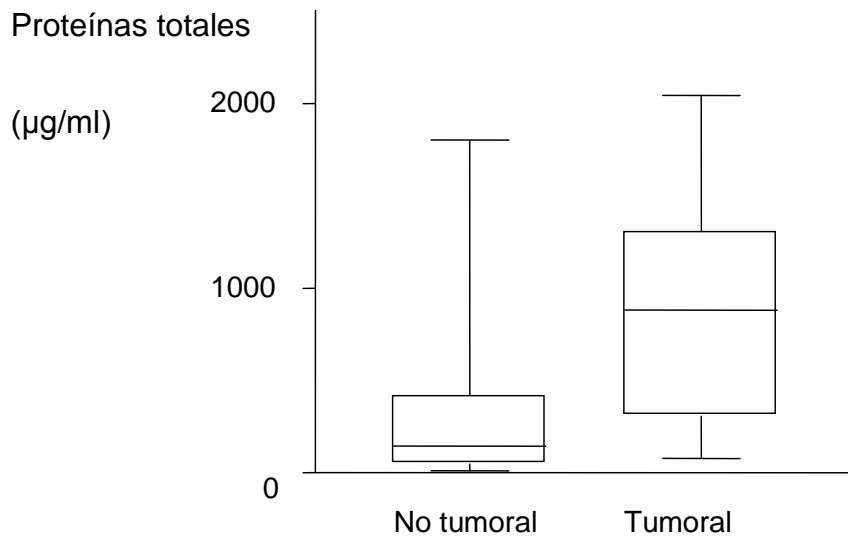
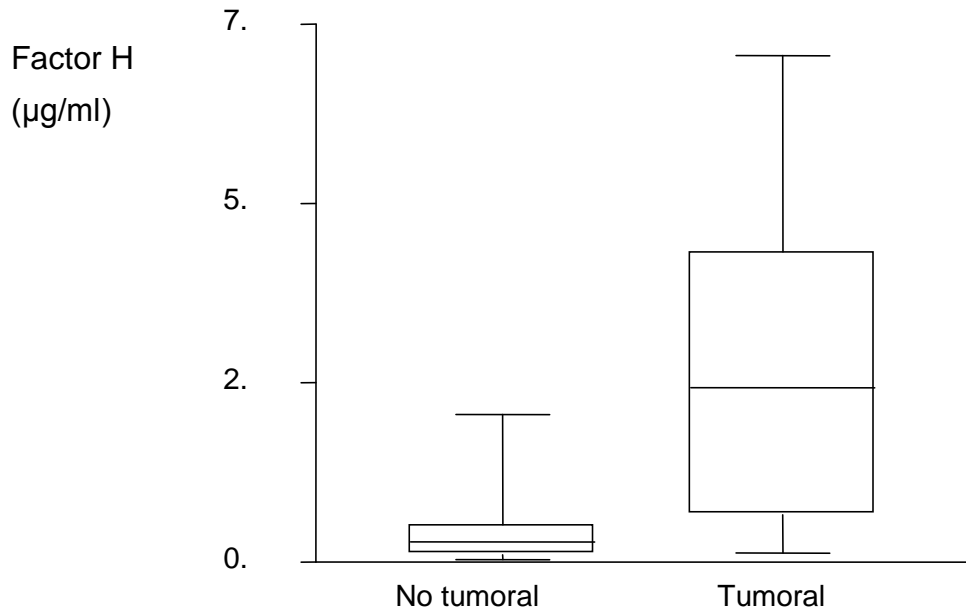
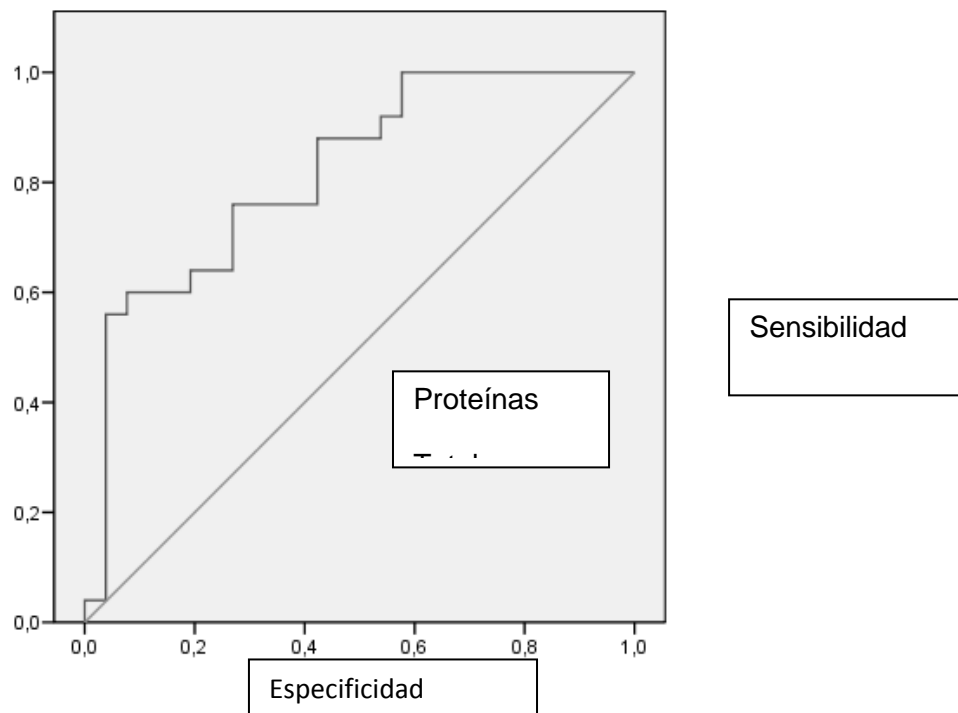
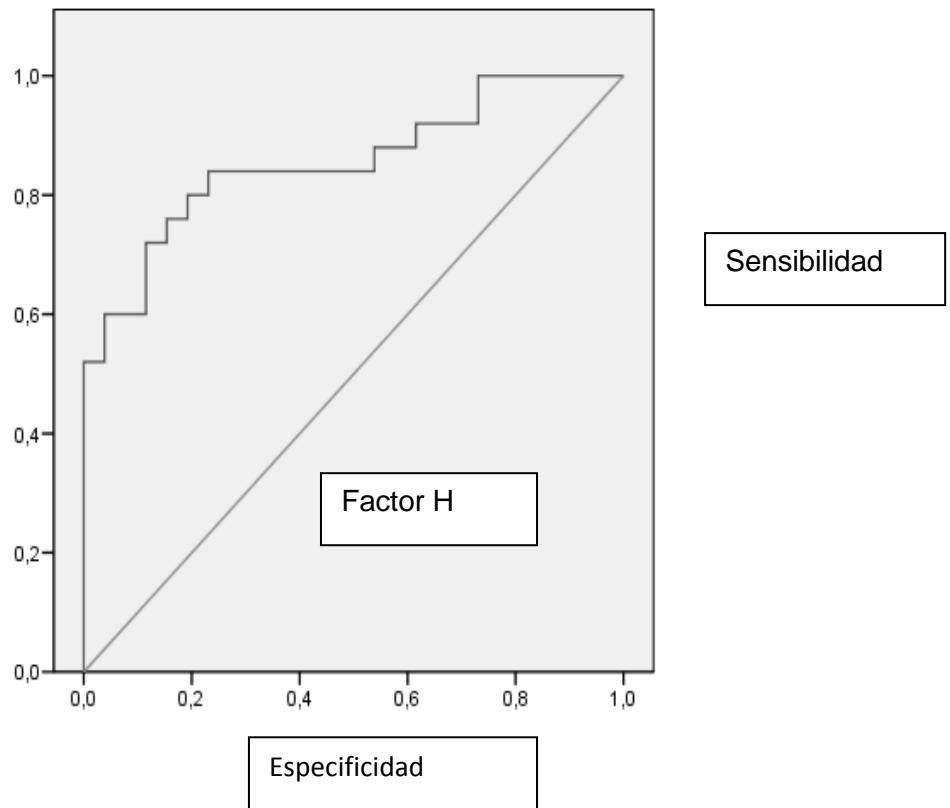


Figura 31. Curvas ROC



V. DISCUSIÓN.

El cáncer de pulmón es una enfermedad caracterizada por una alta mortalidad y un diagnóstico tardío, generalmente en fases avanzadas de la enfermedad (42). Este hecho condiciona los escasos avances habidos en los últimos 30 años en el pronóstico de este proceso (1). El diagnóstico de esta enfermedad plantea pues el reto de buscar herramientas que permitan en primer lugar facilitar el diagnóstico de cáncer lo más rápido posible una vez detectada una lesión sospechosa en pulmón, e idealmente servir como marcadores para en un futuro conseguir identificar pacientes potencialmente portadores de la enfermedad en los estadios iniciales de la misma.

La broncoscopia es el procedimiento habitual para el estudio de pacientes con cáncer de pulmón. Aunque presenta una muy alta rentabilidad diagnóstica para las lesiones centrales y endoscópicamente visibles, la sensibilidad disminuye notablemente en lo que se refiere a lesiones periféricas o distales no visibles (62). Dentro de las técnicas diagnósticas realizadas a través de la broncoscopia, el lavado broncoalveolar ha demostrado ampliamente su utilidad para la obtención de muestras representativas de las partes más distales de la vía aérea, tanto en procesos tumorales como inflamatorios o infecciosos (72, 73). Esta técnica es muy accesible, permite la obtención de material abundante y de buena calidad proveniente del árbol bronquial, y, en comparación con otros métodos, tiene muy escasa morbi-mortalidad (63).

El lavado broncoalveolar es por lo tanto una técnica muy conocida por los neumólogos, que ha sido utilizada en el estudio de las enfermedades pulmonares en un intento de acceder de forma directa a tomar muestras del proceso inflamatorio, infeccioso o tumoral que pueda ocurrir en el pulmón (101). Uno de los primeros ejemplos fue su

utilización en el estudio de las enfermedades pulmonares desde 1967 por Finley (102). Ejemplo típico de este uso es su aplicación en las enfermedades alveolointersticiales difusas. A pesar de la "madurez" de la técnica, su contribución todavía está en desarrollo en el diagnóstico (por ej, fenotipo linfocitario en la sarcoidosis, diagnóstico serológico de la proteinosis alveolar, etc.); pero su papel es mayor en la evaluación de la patogenia de los procesos pulmonares (fibrosis pulmonar idiopática, neumonía eosinófila crónica), permitiendo aportar claves más precisas en el abordaje terapéutico, así como permitir su evaluación en la práctica clínica (101). La base de este abordaje sería que los cambios en el fluido del lavado broncoalveolar, tanto a nivel bioquímico como celular, podrían reflejar las reacciones pulmonares en las enfermedades, tanto neoplásicas como no (103).

Sin embargo, aunque el examen del material obtenido por broncoscopia en cáncer tiene muy pocos falsos positivos, falla en un número apreciable de pacientes, especialmente con tumores periféricos, alcanzando el diagnóstico sólo en la mitad de ellos (63) y precisando otras exploraciones más agresivas. En algunos pacientes, estas exploraciones presentan un riesgo elevado de complicaciones. Por ello podría ahorrar exploraciones invasivas el mejorar su rentabilidad cuantificando la expresión de determinados biomarcadores en lavado broncoalveolar.

Sin duda, el lavado broncoalveolar tiene las desventajas de las complicaciones asociadas a su característica invasiva y aunque se ha intentado evitar su utilización mediante la determinación de diversas sustancias a nivel sanguíneo, no se ha conseguido su implantación. Esto se debe a los malos resultados encontrados cuando se determinan estos posibles biomarcadores a nivel de la circulación general (104, 105,

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

106, 107, 108). La ventaja del lavado broncoalveolar, es que nos proporcionaría una ventana a la visión "más directa" de lo que sucede en el pulmón (109).

Entre las sustancias detectadas en el lavado broncopulmonar de los pacientes con patología pulmonar no tumoral, nos encontramos con tal variedad que sería necesario todo un gran ensayo para describirlas. Para mostrar la gran variabilidad de los marcadores de inflamación, y su diferente utilidad, mostramos unos ejemplos a continuación:

- * Determinación de citoquinas en el lavado bronquial de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial en el seno de una esclerosis sistémica (110).

- * Determinación de citoquinas en la predicción de la mortalidad de pacientes con neumonía grave adquirida en la comunidad (111). Diferentes citoquinas (interleuquina -IL- 1 beta, IL-6, IL-8, IL-10 y factor de necrosis tumoral), la proteína C y endotoxinas son expresadas en el lavado broncoalveolar y se asocian con la mortalidad hospitalaria, presentando un valor pronóstico.

- * Presencia de un incrementado número de células epiteliales ciliadas en el lavado bronquial en pacientes con quemaduras faciales graves (112).

- * Determinación del antígeno Kerbs von Lungren 6 (KL-6) en el lavado broncoalveolar de pacientes con síndrome de distress respiratorio agudo (113, 114). El KL-6 representa un marcador de la disfunción de los neumocitos tipo II en pacientes con distress grave, dotando a su determinación elevada de un factor pronóstico adverso.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

* Determinación de la concentración de citoquinas en pacientes con tuberculosis pulmonar (115). El TNF-alfa demostró su utilidad en este sentido.

* Determinación de balance intracelular Th1/Th2 en células T CD4(+) en pacientes con neumonía intersticial activa (116).

* Determinación de niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en el lavado broncoalveolar de pacientes con lesión pulmonar aguda de diferente etiología, influyendo directamente en el pronóstico (117).

* Cuantificación de niveles de KL-6, SP-A y SP-D en la neumonía eosinófila (118).

* Expresión de citoquinas tipo TH2 en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma (119).

* Determinación de IL-beta para predecir la viabilidad de un pulmón procedente de un donante a corazón parado (120).

* Determinación de niveles de inhibidor de la proteasa segregada por los leucocitos (SLPI) en el lavado broncoalveolar en las complicaciones pulmonares postoperatorias de pacientes con cáncer esofágico (121).

* Determinación de CA19-9 en la fibrosis intersticial no específica (122).

Numerosos biomarcadores tumorales han sido investigados previamente para el diagnóstico de cáncer de pulmón. Por ejemplo mutaciones en Kras o p53 (42). Sin embargo, al ser una enfermedad muy heterogénea se producen múltiples variaciones en expresión de alteraciones genéticas y epigenéticas, por lo que ningún marcador hasta el momento se ha considerado herramienta diagnóstica con una suficiente sensibilidad y especificidad. De hecho, se ha sugerido la necesidad de emplear baterías

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

de marcadores para identificar diferentes patrones de alteración genética y minimizar los falsos negativos.

Los tumores pulmonares periféricos han recibido una atención especial en la bibliografía relacionada con la búsqueda de marcadores en el lavado broncoalveolar, pues su "invisibilidad" a la broncoscopia hace que necesitemos el apoyo de determinaciones bioquímicas (123, 124, 103). Así, cuando se estudia la eficacia del antígeno asociado al melanoma (MAGE; *melanoma-associated antigen*) en el cáncer de pulmón, su determinación por PCR muestra una sensibilidad más alta (64%) que la citología convencional, sin relación con los tipos histológicos o el estadio clínico; si se analiza el tamaño del tumor, se observa que las tasas de detección eran 74% en tumores más grandes de 3 cm y de 58,7% en aquellos más pequeños de 3 cm (123). Esto haría que la determinación del MAGE mediante PCR en lavado bronquial puede ser un método diagnóstico útil para el cancer pulmonar periférico en la práctica clínica (123). Se han evaluado los marcadores tumorales CA 125, CEA, CYFRA21-1 en el lavado broncoalveolar en pacientes con cancer de pulmón no de células pequeñas; la sensibilidad y especificidad del CEA y CA 125 en el lavado broncoalveolar llegó al 100%, 84% y 92%, 80%, respectivamente en un estudio(124). Los autores acaban sugiriendo que entre los marcadores elegidos la determinación del CEA en el lavado broncoalveolar puede ser de la mayor utilidad en el diagnostico de carcinoma de pulmón no de células pequeñas y que puede ser un método complementario en el diagnostico de pacientes que presentan tumores que no pueden ser visualizados mediante la broncoscopia. Como tercer ejemplo de valoración de cancer pulmonar periférico, se ha estudiado el fenotipo linfocitario mediante anticuerpos monoclonales

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

CD3, CD20, CD4, CD8, CD57, CD1, CD25, CD 71 y HLA-DR, en los pacientes con cancer pulmonar periférico con respecto a los individuos control, encontrándose en los pacientes con cáncer una mayor proporción de células T, un relativamente más bajo ratio CD4/CD8, y un relativamente mayor porcentaje de linfocitos HLA-DR+, sin diferencias respecto a si los pacientes fumaban o no (103).

Las sustancias utilizadas como marcadores en el lavado broncoalveolar en los pacientes con neoplasia pulmonar son numerosas. Los estudios sobre todo se centran en buscar aquellos marcadores cuya determinación precoz propicie un tratamiento que permita la curación al actuar de forma lo más temprana posible. Entre los diferentes marcadores tumorales utilizados podemos destacar algunos:

- * Fragmento 19 de la citoqueratina (CYFRA 21-1) (125). Su valor diagnóstico es pobre.

- * Estudio de la activación de los fibroblastos, eosinofilos y mastocitos (126). Se analiza la triptasa, el ácido hialurónico y la proteína catiónica de eosinofilos (ECP), con mayor utilidad de la triptasa y ECP.

- * Determinación molecular de células tumorales (127).

- * Determinación de endopeptidasa neural (NEP) (128). La NEP es una enzima de superficie celular que hidroliza péptidos pequeños, algunos de los cuales son factores de crecimiento; en los pacientes con cáncer de pulmón sus niveles están disminuídos.

- * Marcadores epiteliales, entre los que destaca la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) (129).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

* Concentración de marcadores tumorales secretados por los carcinomas broncogénicos: antígeno carcinoembrionario, enolasa neuroespecífica, antígeno polipeptido tisular (TPA), antígeno polipéptido específico (TPS) y CYFRA 21.1 (130, 131).

* Actividad de la telomerasa en lavado bronquial (132, 133). La telomerasa es una enzima ribonucleica, y se ha reconocido como un marcador específico para enfermedad maligna pulmonar.

* Actividad aumentada de las colagenasas en los macrófagos en el lavado bronquial para el estudio del cáncer de pulmón de células no pequeñas (134). Las metaloproteinasas (MMPs) son liberadas por los macrófagos en el tejido de pacientes con cáncer de pulmón. La sensibilidad del test fue del 85,7% en el total de pacientes en fumadores y en 88,2% de exfumadores.

* Determinación de la metilación específica de tumor en lavado broncoalveolar en la detección precoz de cáncer de pulmón de células no pequeñas (135).

* Utilización de p63 como inmunomarcador en el diagnóstico de carcinoma de células escamosas (136). El anticuerpo p63 ha sido utilizado para distinguir el carcinoma de células escamosas del adenocarcinoma. La sensibilidad del p63 para el carcinoma de células escamosas es del 100% y la especificidad del 90,4%. Su poder identificativo de este tipo de tumores es evidente.

* Biomarcadores basados en la metilación del ADN para la detección precoz del cáncer de pulmón no de células pequeñas (137).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

* Enolasa neuroespecífica (NSE) en lavado broncoalveolar (109). Es un parámetro bien conocido en el cáncer de células pequeñas, aunque puede elevarse también en el cancer de células no pequeñas y en el bronquítico crónico.

* Elevación de IL-6 en lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de células no pequeñas (108).

* Estado pro-oxidante e inflamatorio en pacientes con cancer (138). En pacientes con cancer se ha observado un incremento de los marcadores oxidativos e inflamatorios.

* Estudio tumoral de lavado broncoalveolar utilizando tecnología proteómica (139).

* Cuantificación de ARN libre en lavado broncoalveolar (140).

* Analisis de factores de crecimiento insulina-like (141). Son básicamente el IGF-1 y el IGFBP-3.

En estos estudios comentados y la mayoría de los publicados, las series son pequeñas o los valores discriminativos no son altos y se da una alta cantidad de falsos negativos y positivos (109). Por ello se ha propuesto la combinación de diferentes marcadores que nos pueden ayudar a mejorar nuestro poder diagnóstico o la monitorización del tratamiento (130, 132). Estos marcadores podrían completar el diagnostico histopatológico/citológico del cáncer, sin tener todavía un papel predominante (142). No hay que dejar de recordar que ésto es un paso, pero el diagnóstico del cáncer de pulmón es un gran camino con multiples paradas diagnósticas (143).

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

El factor H del complemento es una glicoproteína de 150 kDa, la más importante de una familia de proteínas (que incluye el FHL-1) cuya principal función conocida es la regulación del factor C3b del complemento, inhibiendo la C3 convertasa. Recientemente se ha demostrado que esta proteína del complemento juega un papel clave en la resistencia mediada por el complemento (actuando por lisis celular) en una variedad de células cancerosas (144). Como hemos visto ha sido descrita su presencia en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón (124), pero son escasos los estudios donde se utiliza como marcador tumoral pulmonar (144, 145). Por otra parte ha demostrado su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de otros tumores, en especial el cáncer de vejiga (135, 146, 147, 148).

En el trabajo de Cui et al se estudia el valor del factor H del complemento en el adenocarcinoma pulmonar (144), que cuando muestra una gran expresión se correlaciona con la presencia del adenocarcinoma pulmonar. Si utilizaba un análisis de la supervivencia de Kaplan-Meier, observó una tendencia de un peor pronóstico en los tumores positivos a factor H del complemento en relación a los tumores negativos para el factor H del complemento. Además comprueban que los tumores no de células pequeñas expresan y secretan factor H del complemento por lo que lo proponen como marcador del adenocarcinoma. Nosotros vemos que se puede extender su uso a otras estirpes celulares. En el trabajo de Amornsiripanitch et al, se observa que los anticuerpos contra el factor H del complemento marcan un estadio inicial en los cánceres pulmonares no de células pequeñas (145); observaron que los anticuerpos para los carcinomas no de células pequeñas en estadio I se registraban en el 50% de los pacientes y solo en el 11% de los últimos estadios.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

La hipótesis inicial de este trabajo era que la concentración de factor H en lavado broncoalveolar puede servir como marcador de la presencia de cáncer de pulmón, aumentando la rentabilidad diagnóstica de la broncoscopia en los tumores periféricos. Ante la menor accesibilidad de éstos para la obtención de muestras con respecto a los tumores centrales, se investigó si existían diferencias significativas entre los dos grupos. Los datos demostraron que ambos grupos presentaban elevación del marcador sin diferencias significativas entre ellos, quedando claro que el LBA era una herramienta totalmente válida para la obtención de muestras valorables.

El planteamiento inicial del estudio era que el factor H del complemento podría estar incrementado en el lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón debido a su producción y secreción por las células tumorales.

Sin embargo uno de los hallazgos fundamentales del estudio descartaba esta posibilidad, pues el factor H aparece significativamente elevado independientemente de los tipos histológicos; así tipos tumorales que no expresan factor H, como el cancer de células pequeñas, tienen altos niveles de factor H. En nuestro trabajo queda claro este dato.

En este punto del estudio se plantea la cuestión del origen del Factor H. Si no proviene de la secreción de las células tumorales, una posible explicación de su presencia podría ser el sangrado endobronquial, frecuente en la broncoscopia diagnóstica de cáncer de pulmón. Se cuantificó el nivel de hemoglobina, descartando esta posibilidad pues no presentaba diferencias significativas entre los grupos y además no correlacionaba con el Factor H. Se determinaron también los niveles de albúmina y de proteínas totales,

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

para valorar su posible correlación con la presencia de factor H, como proteína procedente del plasma.

Los datos presentados en el estudio demostraron que no sólo se produce un aumento de factor H, que efectivamente presenta significación estadística, sino que también la albúmina y las proteínas plasmáticas están significativamente aumentadas con respecto al grupo control en los pacientes con cáncer de pulmón. Estos resultados sugieren que las células tumorales no son la fuente de la molécula.

Hay que destacar que existe una alta correlación entre el factor H, la albúmina y las proteínas totales, y los tres valores se comportan de forma muy similar en términos de eficacia diagnóstica. La explicación más probable es que estos tres biomarcadores aparecen en la luz bronquial como resultado de la exudación de proteínas plasmáticas.

Charokopos et al demostraron en 2004 que el lavado bronquial de pacientes con carcinoma pulmonar presenta una concentración incrementada de la albúmina (149).

Incluso valoró si utilizar la albúmina como marcador tumoral. En dicho estudio se obtiene una sensibilidad del 93% y una especificidad del 96% para la determinación de albúmina en el BAL de pacientes con cáncer de pulmón con respecto al grupo control.

En vista de estos resultados, hay que buscar una causa para explicar la presencia de grandes proteínas plasmáticas como la albúmina o el factor H. Una hipótesis razonable sería que reflejan un aumento de la permeabilidad microvascular de la circulación tumoral.

De hecho, el aumento de extravasación de macromoléculas debido a hiperpermeabilidad es una propiedad de los vasos tumorales y es la consecuencia de una intensa inflamación combinada con angiogénesis tumoral (150, 151). Se piensa

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

también que la hiperpermeabilidad de los vasos tumorales contribuye a la progresión tumoral (151, 152). Además esta exudación es más intensa que en situaciones inflamatorias, lo que explicaría que otras enfermedades inflamatorias muestren bajos niveles de proteínas plasmáticas en el lavado bronquial.

En el presente estudio objeto de esta tesis se ha establecido un punto de corte que permite una sensibilidad del 83% para los 3 marcadores y un 76% de sensibilidad para el factor H y las proteínas totales, y un 73% para la albúmina.

Se observó ausencia de correlación entre los tres marcadores y el tabaquismo, apoyado por trabajos previos que no encuentran diferencias entre fumadores y no fumadores en niveles de albúmina y proteínas totales (153). Esto tiene su importancia, pues existen trabajos que muestran cómo diversos marcadores tumorales son secretados con mayor probabilidad en pacientes fumadores que en no fumadores, pues el tabaco podría ser en parte responsable de la secreción de estos marcadores (130, 131, 134).

Tampoco se halló diferencia entre los distintos tipos de tumor, siendo su alta permeabilidad y exudación de proteínas plasmáticas común a todos los tipos histológicos. Esto supondría para un marcador la ventaja de superar la alta heterogeneidad del cáncer.

En definitiva se ha podido demostrar la utilidad de cuantificar el factor H en lavado broncoalveolar para identificar pacientes con alta probabilidad de cáncer de pulmón después de una broncoscopia falso negativo, en la línea de otros trabajos anteriores, incrementando el rendimiento convencional de la citología. Un test barato como medir dicho factor, o bien otros marcadores proteicos como las proteínas totales o la

albúmina representaría información adicional apoyando la presencia de tumor. Otros estudios deben realizarse para determinar su utilidad potencial en la práctica clínica.

La importancia de estos hallazgos reside en el hecho de que la cuantificación del biomarcador es un método no invasivo fácil de realizar que puede coadyuvar a la rentabilidad diagnóstica de la broncoscopia y así facilitar la decisión sobre realizar otros procedimientos diagnósticos invasivos. La utilidad se presentaría en los casos de citología negativa, sobre todo en lesiones periféricas, en las cuales el rendimiento de la broncoscopia es bajo, y especialmente en aquellos pacientes en situación límite con alto riesgo para otras exploraciones invasivas. Un test positivo apoyaría la presencia de tumor y sería un motivo para continuar realizando técnicas más invasivas para obtener nuevas muestras de tejido. La cuantificación de los tres marcadores en nuestro estudio podría clasificar como sugestivos de ser positivos en torno al 65% de los falsos negativos en tumores centrales y el 50% en periféricos. Son precisos nuevos estudios, con series más largas de pacientes, para objetivar sensibilidad del examen citológico combinado con marcadores moleculares, así como para los valores de referencia que diferencien malignos de benignos. La búsqueda de dichos marcadores podría incluso permitir en un futuro abrir la puerta a un diagnóstico precoz de cáncer de pulmón, tan necesario para modificar el pronóstico de estos pacientes

VI. CONCLUSIONES.

- 1) Los niveles de factor H en el lavado broncoalveolar están más elevados en los casos con cáncer de pulmón que en los pacientes sin enfermedad maligna pulmonar. Con un punto de corte de 1 µg/ml, su sensibilidad de detección del cáncer de pulmón es del 82% y la especificidad del 77%.
- 2) No se han encontrado diferencias en los niveles de factor H en los diferentes tipos histológicos de neoplasias malignas pulmonares.
- 3) La cuantificación de factor H podría ser útil en el diagnóstico de los nódulos periféricos con estudio citológico inicial negativo, añadiendo un elemento más para tomar la decisión de realizar o no nuevas pruebas, especialmente en pacientes con alto riesgo para la realización de pruebas diagnósticas invasivas.
- 4) Otros marcadores proteicos en lavado broncoalveolar podrían ser también útiles en este sentido, encontrando en nuestro estudio unos valores en la sensibilidad y especificidad del 82% y 71% para las proteínas totales y 83% y 71% para la albúmina.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Alberg AJ, Ford JG and Samet JM Epidemiology of Lung Cancer ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines(2nd Edition) Chest 2007;132;29S-55S
- (2) White C. Research on smoking and lung cancer: a landmark in the history of chronic disease epidemiology. Yale J Biol Med 1990; 63:29–46
- (3) Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. BMJ 1954; 1:1451–1455
- (4) Doll R, Hill AB. Lung cancer and other causes of death in relation to smoking: a second report on the mortality of British doctors. BMJ 1956; 2:1071–1081
- (5) Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1996, with a especial section on lung cancer and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst 1999; 91:675–690
- (6) Ries L, Eisner M, Kosary C, eds. Cancer statistics review, 1975–2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2005 21 Cancer facts and figures. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2006
- (7) Mao Y, Hu J, Ugnat AM, et al. Socioeconomic status and lung cancer risk in Canada. Int J Epidemiol 2001; 30:809–817
- (8) World cancer report. Lyon, France: IARC Press, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2003
- (9) Proctor R. The Nazi war on cancer. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1999

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(10) Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *BMJ* 1950; 2:739–748

(11) Smoking and health: summary of a report of the Royal College of Physicians of London on smoking in relation to cancer of the lung and other diseases. London, UK: Pitman Medical Publishing, 1962; S2–S70

(12) Smoking and health: report of the Advisory Committee to the Surgeon General. Washington, DC: US Government Printing Office, US Department of Health Education and Welfare, 1964; publication No. 1103

(13) 13 The health consequences of involuntary smoking: a report of the Surgeon General. Washington, DC: US Government Printing Office, US Department of Health and Human Services, 1986; publication 87–8398

(14) Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington, DC: US Government Printing Office, US Environmental Protection Agency, 1992; publication EPA/600/600F

(15) Boffetta P. Involuntary smoking and lung cancer. *Scand J Work Environ Health* 2002; 28(suppl):30–40

(16) Saracci R, Boffetta P. Interactions of tobacco smoking and other causes of lung cancer. In: Samet JM, ed. *Epidemiology of lung cancer*. New York, NY: Marcel Dekker, 1994; 465–493

(17) Coultas DB, Samet JM. Occupational lung cancer. *Clin Chest Med* 1992; 13:341–354

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(18) Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2004; 108:269–276.

(19) Samet JM, Cohen AJ. Air pollution and lung cancer. In: Holgate S, Samet JM, Koren HS, et al, eds. *Air pollution and health*. San Diego, CA: Academic Press, 1999; 841–864

(20) Willett WC. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect* 1995; 103(suppl 8):165–170

(21) Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995; 75:191–202

(22) Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, Amos CI, Gu X, Strong LC. Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: asociación between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Hum Genet* 2003;113:238-43.

(23) Sanders BM, Jay M, Draper GJ, Roberts EM. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer* 1989; 60:358-65.

(24) Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 2004;75:460-74.

(25) Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 2005; 37:1315-6.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(26) Amos CI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs

identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008;40:616-22.

(27) Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps

to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008;452: 633-7.

(28) Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine

dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008;452:638-42.

(29) Lam DC, Girard L, Ramirez R, et al. Expression of nicotinic acetylcholine receptor

subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and

nonsmokers. *Cancer Res* 2007;67: 4638-47.

(30) Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer:

the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:689-

98.

(31) Roy S, Herbst, John V. Heymach, and Scott M. Lippman, Molecular Origins of

CancerLung Cancer *N Engl J Med* 2008;359:1367-80.

(32) Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to

epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin*

Oncol 2007;25:587-95.

(33) Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

2008;358:1160-74.

(34) Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008;26:3351-7.

(35) Tsao M-S, Sakurada A, Cutz J-C, et al. Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-44. [Erratum, *N Engl J Med* 2006;355:1746.]

(36) Ji H, Li D, Chen L, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* 2006;9:485-95.

(37) Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005;65:1642-6.

(38) Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer* 2006; 118:1426-9.

(39) Wislez M, Spencer ML, Izzo JG, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. *Cancer Res* 2005;65:3226-35

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(40) Shah U, Sharpless NE, Hayes DN. LKB1 and lung cancer: more than the usual suspects. *Cancer Res* 2008;68:3562-5.

(41) Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007;450:893-8

(42) Li Mao Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer, *Oncogene* (2002) 21, 6960 - 6969

(43) Mishina T, Dosaka-Akita H, Hommura F, Nishi M, Kojima T, Ogura S, Shimizu M, Katoh H and Kawakami Y. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2000 jan; 6,(1): 11-6

(44) Ramí Porta, Ramón, Nueva clasificación TNM del cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*, 2009;45: 159-61, Vol 45 nº 04

(45) Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, et al.: The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2 (12): 1067-77, 2007)

(46) Ana Ruiz Alonso, M^a Auxiliadora Cabezón Pons, Marta Lloret Sáez Bravo y Pedro C. Lara Jiménez. 2004, "Cáncer de pulmón", en www.biocancer.com

(47) Normativa Separ Diagnóstico y estadificación del carcinoma broncogénico, Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (GCCB-S).

Archivos de Bronconeumol 2001; 37: 495-503

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(48) Diagnostic imaging of lung cancer. N. Hollings, P. Shaw. Eur Respir J 2002; 19: 722–742.

(49) Cascade PN, Gross BH, Kazerooni EA, et al. Variability in the detection of enlarged mediastinal lymph nodes in staging lung cancer: a comparison of contrast-enhanced and unenhanced CT. Am J Roentgenol 1998; 170: 927–931.

(50) Kramer H, Groen HJM. Current concepts in the mediastinal lymph node staging in suspected lung cancer: Comparison of positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose and mediastinoscopy. Ann Thorac Surg 2003; 75: 231-235.

(51) Toloza EM, Harole L, Mc Crory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. Chest 2003; 123(1 suppl): 147S-156S.

(52) Silvestri GA, Tanoue LT, Margalis L, Barker J, Detterbeck F. The noninvasive satging of non-small cell lung

(53) Hatabu H, Stock KW, Sher S, et al. Magnetic resonance imaging of the thorax. Past, present, and future. Clin Chest Med 1999; 20: 775–803

(54) Diagnostic imaging of lung cancer. N. Hollings, P. Shaw. Eur Respir J 2002; 19: 722–742

(55) Gould MK, Maclean CC, Kuschner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. JAMA 2001, 285(7):914-24. cancer: the gidelines. Chest 2003; 123 (1 sppl): 147S-156S.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(56) Gupta NC, Rogers JS, Graeber GM, et al. Clinical role of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging in patients with lung cancer and suspected malignant pleural effusion. *Chest* 2002; 122:1918-1924.

(57) Erasmus JJ, McAdams HP, Rossi SE, et al. FDG PET of pleural effusions in patients with non-small cell lung cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 245-249.

(58) Birim O, Kappetein AP, Stijnen T, Bogers JJC. Metaanalysis of positron emission tomographic and computed tomographic imaging in detecting mediastinal lymph node metastases in non-smallcell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:375-81.

(59) M. Provencio¹, A. Sánchez¹, C. González², F. Valcárcel³, A. Varela⁴, A. Maldonado, J. González-Alenda⁵, J. Moradiellos⁴, J. L. Chamorro⁶ La PET y PET-CT en la estadificación y tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico *Oncología*, 2007; 30 (3):100-112

(60) Lardinois D, Weder W, Roudas M, et al. Etiology of solitary extrapulmonar positron emisión tomography and computed tomography findings in patients with lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6846-6853.

(61) Castella J, Puzo M^a C. Estructura y función de las vías aéreas inferiores. En: *Broncología*. Barcelona. (Ed): Salvat, 1982; pag 1-16.

(62) Rodolfo Álvarez-Sala, Luis Gómez Carrera, Juan José Cabanillas Broncoscopia diagnóstica. En *Broncoscopia diagnóstica y terapéutica* . Monografías Neumomadrid. Prudencio Díaz-Agero Álvarez, Javier Flandes Aldeyturriaga

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(63) Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: Summary of published evidence. *Chest* 2003, 123(1 Suppl):115S-28S.

(64) Xie HB, Cornwell R, Grossman JE, Hoerl HD, Kurtycz DF. Bronchoscopy-guided transtracheal and transbronchial fine-needle aspiration biopsy: a 5-year institutional review of 111 cases. *Diagnostic Cytopathology* 2002, 27(5):276-81.

(65) Rintoul RC, Skwarski KM, Murchison JT, Wallace WA, Walker WS, Penman ID. Endobronchial and endoscopic ultrasound-guided real-time fine needle aspiration for mediastinal staging. *Eur Respir J.* 2005;25:416-21

(66) Laudanski J, Kozlowski M, Spacing A, Chyczewski L. The preoperative study of mediastinal lymph nodes metastasis in lung cancer by endoscopic ultrasonography (EUS) and helical computed tomography (CT). *Lung Cancer* 2001, 34(Suppl 2):S123-S126.

(67) Laroche C, Fairbairn I, Moss H, Pepke-Zaba J, Sharples L, Flower C et al. Role of computed tomographic scanning of the thorax prior to bronchoscopy in the investigation of suspected lung cancer. *Thorax* 2000, 55(5):359-63.

(68) Bungay HK, Pal CR, Davies CW, Davies RJ, Gleeson FV. An evaluation of computed tomography as an aid to diagnosis in patients undergoing bronchoscopy for suspected bronchial carcinoma. *Clinical Radiology* 2000, 55(7):554-60

(69) Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 559-573.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(70) Martín Juan, J. Guía de procedimientos: lavado broncoalveolar. Neumosur 6, 2, septiembre 1994, 34-39

(71) J. De Gracia. Lavado broncoalveolar en el diagnóstico de neoplasia de pulmón. Neumosur, 8, 1, marzo 1996, 69-73

(72) Dowlati A, Bury T, Corhay JL, Weber T, Mendes P, Radermecker M. High neuron specific enolase levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung carcinoma. Diagnostic value, relation to serum neuron specific enolase, and staging. Cancer 1996; 77: 2039-43.

(73). Lehman TA, Scott F, Seddon M, Kelly K, Dempsey EC, Wilson VL, Mulshine JL, Modali R. Detection of K-Ras oncogene mutations by polymerase chain reaction-based ligase chain reaction. Analytical Biochem 1996; 239: 153-9.

(74) Gasparini S, Ferretti M, Secchi EB, Baldelli S, Zucato L, Gusella P. Integration of transbronchial and percutaneous approach in the diagnosis of peripheral pulmonary nodules or masses. Experience with 1,027 consecutive cases. Chest 1995; 108: 131-137.

(75) Salazar A, Westcott JL. The role of transthoracic needle biopsy for the diagnosis and staging of lung cancer. Clin Chest Med 1993; 14: 99-109.

(76) De Gregorio Ariza MA, Torre Nuez J, Alfonso Agurán ER, Duce García F, Villavieja Atance JL, Bustamante Arias E. Complicaciones y riesgos de la punción aspirativa transtorácica. Estudio en 873 pacientes y revisión de la literatura. Arch Bronconeumol 1990; 26: 186-191.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(77) Fielding P, Turnbull L, Prime W, Walshaw M and Field JK. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection. 1999 Dec;5(12):4048-52

(78) Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA and Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients Cancer Res., 2001 Jun 15 ;61(12),4675-8

(79) Five year survival for lung cancer patients managed in general hospitals Grivaux, M et al Rev Mal Respir 2009 Jan;26(1):37-44

(80) Iáñez, E. Curso de Inmunología General. Universidad de Granada. 2000

(81). Sim E, Wood AB, Hsiung LM, Sim RB. Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. FEBS Lett 1981;132:55–60

(82) Liszewski MK, Atkinson JP. The complement system. In: Paul WE, editor. Fundamental Immunology, Third Edition. New York: Raven Press; 1993. p. 917–39

(83) Ajona D, Castaño Z, Garayoa M, Zudaire E, Pajares MJ, Martínez A, Cuttitta F, Montuenga L, Pio R. Expression of Complement Factor H by Lung Cancer Cells: Effects on the Activation of the Alternative Pathway of Complement Cancer Research 2004, 64, 6310–6318

(84) Schwaeble W, Zwirner J, Schulz TF, Linke RP, Dierich MP, Weiss EH. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. Eur J Immunol 1987;17:1485–9.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(85) Friese MA, Hellwage J, Jokiranta TS, et al. Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2000;121:406–15.

(86). Serrano J, Encinas JM, Fernandez AP, et al. Distribution of immunoreactivity for the adrenomedullin binding protein, complement factor H, in the rat brain. *Neuroscience* 2003;116:947–62.

(87). Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 1999;20:135–40

(88) Whaley K, Ruddy S. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 1976;144:1147–63

(89). Harrison RA, Lachmann PJ. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol* 1980;17:9–20.

(90) Córdoba SR, Jorge EG, Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol* 2008, Jan;151(1):1-13.

(91) Jozsi M, Zipfel PF Factor H family proteins and human diseases, *Trends Immunol* 2008, Aug; 29(8):380-7

(92) Gasque P, Julien N, Ischenko AM, et al. Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines. *J Immunol* 1992;149:1381–7.

(93) Masque P, Thomas A, Fontaine M, Morgan BP. Complement activation on human

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins. *J Neuroimmunol* 1996;66:29–40.

(94). Legoedec J, Gasque P, Jeanne JF, Fontaine M. Expression of the complement alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I. *Eur J Immunol* 1995;25:3460–6.

(95) Junnikkala S, Hakulinen J, Jarva H, et al. Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells. *Br J Cancer* 2002;87:1119–27.

(96) Kinders R, Jones T, Root R, et al. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res* 1998;4:2511–20.

(97) Katz Y, Guterman M, Lahat E. Regulation of synthesis of complement proteins in HEp2 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67:117–23.

(98) Meri S, Jokiranta TS. Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin Chem* 2005 ;51(5):856-63

(99) Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmaso AP. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol*

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

1996;149:129–42.

(100)Cuttitta F, Pio R, Garayoa M, et al. Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2002;57:110–9.

(101) Pérez Arellano JL. Lavado broncoalveolar en la enfermedad pulmonar intersticial. *Ultimas noticias. Arch Bronconeumol* 2002;38(2):57-9.

(102). Finley TN, Swenson EW, Curran WS, Hurber GL, Landman AJ. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann Intern Med* 1967;66:651-8.

(103). Domagała-Kulawik J, Guzman J, Costabel U. Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer--analysis of 140 cases. *Respiration*. 2003 Jan-Feb;70(1):43-8.

(104). Honda K, Okada F, Ando Y, Mori H, Umeki K, Ishii H, Kadota J, Ando M, Miyazaki E, Kumamoto Intracellular detection of interleukin 17 and other cytokines in human bronchoalveolar lavage fluid: a first assessment. *Immunol Lett*. 2012 Jan 30;141(2):204-9. Epub 2011 Oct 14.

(105). Miyoshi S, Hamada H, Kadowaki T, Hamaguchi N, Ito R, Irifune K, Higaki J. Comparative evaluation of serum markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2010 Jun;137(6):1391-7. Epub 2010 Jan 15.

(106). Abdel Salam I, Gaballa HE, Abdel Wahab N. Serum levels of epidermal growth factor and HER-2 neu in non small-cell lung cancer: prognostic correlation. *Med Oncol*. 2009;26(2):161-6. Epub 2008 Dec 18.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(107). Koç M, Ediger D, Budak F, Karadağ M, Oral HB, Uzaslan E, Ege E, Gözü RO. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori*. 2006 Mar-Apr;92(2):149-54.

(108). Huang F, Wang XL, Geng Y, Li MX. [Evaluation of IL-6 level in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2005 Jul;21(4):507-9.

(109). Karnak D, Beder S, Kayacan O, Ibiş E, Oflaz G. Neuron-specific enolase and lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 2005 Dec;28(6):586-90.

(110). Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, Becker MO, Huscher D, Burmester GR, Riemekasten G. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R111. Epub 2009 Jul 17.

(111). Lee YL, Chen W, Chen LY, Chen CH, Lin YC, Liang SJ, Shih CM. Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia. *J Crit Care*. 2010 Mar;25(1):176.e7-13. Epub 2009 Jul 9.

(112). Rabello E, Batista VF, Lago PM, Alvares Rde A, Martinusso Cde A, Lapa e Silva JR. Bronchoalveolar lavage analysis in victims of severe facial burns. *J Bras Pneumol*. 2009 Apr;35(4):343-50.

(113). Nathani N, Perkins GD, Tunnicliffe W, Murphy N, Manji M, Thickett DR. Kerbs von Lungren 6 antigen is a marker of alveolar inflammation but not of infection in

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care. 2008;12(1):R12. Epub 2008 Jan 23.

(114). Kondo T, Hattori N, Ishikawa N, Murai H, Haruta Y, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N. KL-6 concentration in pulmonary epithelial lining fluid is a useful prognostic indicator in patients with acute respiratory distress syndrome. Respir Res. 2011 Mar 22;12:32.

(115). Küpeli E, Karnak D, Beder S, Kayacan O, Tutkak H. Diagnostic accuracy of cytokine levels (TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma) in bronchoalveolar lavage fluid of smear-negative pulmonary tuberculosis patients. Respiration. 2008;75(1):73-8. Epub 2007 Nov 1.

(116). Shimizu Y, Kuwabara H, Ono A, Higuchi S, Hisada T, Dobashi K, Utsugi M, Mita Y, Mori M. Intracellular Th1/Th2 balance of pulmonary CD4(+) T cells in patients with active interstitial pneumonia evaluated by serum KL-6. 32. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2006;28(2):295-304.

(117). Dorr AD, Wilson MR, Wakabayashi K, Waite AC, Patel BV, van Rooijen N, O'Dea KP, Takata M. Sources of alveolar soluble TNF receptors during acute lung injury of different etiologies. J Appl Physiol. 2011 Jul;111(1):177-84. Epub 2011 Apr 21.

(118). Ideura G, Minamisawa A, Urushihata K, Hanaoka M, Miyahara T, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K, Tsukadaira A. [A case of acute eosinophilic pneumonia with a disassociation between the KL-6 level and SP-A and SP-D levels in the serum and BAL fluid]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi. 2004 Jul;42(7):640-4.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(119). Kalayci O, Birben E, Tinari N, Oguma T, Iacobelli S, Lilly CM. Role of 90K protein in asthma and TH2-type cytokine expression. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004 Nov;93(5):485-92.

(120). Rega FR, Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Jannis NC, Verleden GM, Lerut TE, Van Raemdonck DE. IL-1beta in bronchial lavage fluid is a non-invasive marker that predicts the viability of the pulmonary graft from the non-heart-beating donor. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Jan;24(1):20-8.

(121). Tsukada K, Miyazaki T, Katoh H, Masuda N, Ojima H, Fukuchi M, Manda R, Fukai Y, Nakajima M, Sohda M, Kuwano H. Relationship between secretory leukocyte protease inhibitor levels in bronchoalveolar lavage fluid and postoperative pulmonary complications in patients with esophageal cancer. *Am J Surg.* 2005 Apr;189(4):441-5.

(122). Totani Y, Saito Y, Miyachi H, Yoneda Y, Shimizu H, Hoshino T, Hayashi M, Uchiyama Y, Isogai S, Matsui K, Hashimoto Y, Umemoto M, Sasaki F, Okazawa M, Sakakibara H. [Clinical characterization of CA19-9 in patients with interstitial pneumonia showing pathological nonspecific interstitial pneumonia pattern]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 2005 Feb;43(2):77-83.

(123). Shin KC, Choi EY, Chung JH, Jeon C, Lee KH. Clinical application of MAGE A1-6 RT-nested PCR for diagnosis of lung cancer invisible by bronchoscopy. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):163-7.

(124). Dabrowska M, Grubek-Jaworska H, Domagała-Kulawik J, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Krenke R, Nejman P, Chazan R. [Diagnostic usefulness of selected tumor

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer]. *Pol Arch Med Wewn.* 2004 Jun;111(6):659-65.

(125). Cremades MJ, Menéndez R, Pastor A, Llopis R, Aznar J. Diagnostic value of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer. *Respir Med.* 1998 May;92(5):766-71.

(126). Márquez Pérez FL, Blasco Ferrándiz R, Callol Sánchez L, Chivato Pérez T, Villegas Fernández F, Gómez de Terreros Sánchez FJ. [Study of mast cell, eosinophil and fibroblast activation in bronchoalveolar lavage fluid in patients with lung cancer]. *Arch Bronconeumol.* 1998 Nov;34(10):484-8.

(127). Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sidransky D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Feb 17;91(4):332-9.

(128). Cohen AJ, Franklin WA, Magill C, Sorenson J, Miller YE. Low neutral endopeptidase levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Mar;159(3):907-10.

(129). Fielding P, Turnbull L, Prime W, Walshaw M, Field JK. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4048-52.

(130). Pardos MC, Alvarez-Sala R, Terreros Caro FJ, Gómez L, Gómez de Terreros FJ,

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

Villamor J. The concentrations of five tumor markers in both BAL fractions in lung cancer patients in relation to cigarette smoking. *Tumori*. 1999 Nov-Dec;85(6):454-7.

(131). Prados C, Alvarez-Sala R, Gómez de Terrero J, Callol L, García Río F, Gómez Carrera L, Gomez de Terreros Caro J, Alvarez-Sala JL, Espinós D, Villamor J. An evaluation of tissue polypeptide antigen (TPA) in the two bronchoalveolar lavage fractions of lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2000 May;30(5):215-20.

(132). Pina TC, Zapata IT, Hernández FC, López JB, Paricio PP, Hernández PM. Tumour markers in serum, bronchoalveolar lavage and biopsy cytosol in lung carcinoma: what environment lends the optimum diagnostic yield? *Clin Chim Acta*. 2001 Mar;305(1-2):27-34.

(133). Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Turnbull L, Walshaw M, Field JK. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer*. 2000 Apr;28(1):37-42.

(134). Hakoda Y, Ito Y, Nagate A, Minemura K, Utsumi K, Aoshima M, Ohyashiki K. Increased collagenase activity in macrophages from bronchial lavage as a diagnostic marker of non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2003 Feb;58(2):122-6.

(135). Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park JH, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2363-70.

(136). Uke M, Rekhi B, Ajit D, Jambhekar NA. The use of p63 as an effective immunomarker in the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinomas on de-stained

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

bronchial lavage cytological smears. *Cytopathology*. 2010 Feb;21(1):56-63. Epub 2009 Sep 9.

(137). Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer*. 2008 Oct 23;7:81.

(138). Kontakiotis T, Katsoulis K, Hagizisi O, Kougioulis M, Gerou S, Papakosta D. Bronchoalveolar lavage fluid alteration in antioxidant and inflammatory status in lung cancer patients. *Eur J Intern Med*. 2011 Oct; 22(5):522-6. Epub 2011 Mar 26.

(139). Oumeraci T, Schmidt B, Wolf T, Zapatka M, Pich A, Brors B, Eils R, Fleischhacker M, Schlegelberger B, von Neuhoff N. Bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients: mapping the uncharted waters using proteomics technology. *Lung Cancer*. 2011 Apr;72(1):136-8. Epub 2011 Feb 18.

(140). Schmidt B, Engel E, Carstensen T, Weickmann S, John M, Witt C, Fleischhacker M. Quantification of free RNA in serum and bronchial lavage: a new diagnostic tool in lung cancer detection? *Lung Cancer*. 2005 Apr;48(1):145-7. Epub 2004 Dec 16.

(141). Unsal E, Köksal D, Yurdakul AS, Atikcan S, Cinaz P. Analysis of insulin like growth factor 1 and insulin like growth factor binding protein 3 levels in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with lung cancer. *Respir Med*. 2005 May;99(5):559-65. Epub 2004 Nov 23.

(142). Sen S, Reddy VG, Khanna N, Guleria R, Kapila K, Singh N. A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Jul;33(1):41-9.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(143). Wei EX, Anga AA, Martin SS, Jackson JG, Nordberg ML, Herrera GA, Turbat-Herrera EA. EGFR expression as an ancillary tool for diagnosing lung cancer in cytology specimens. *Mod Pathol*. 2007 Sep;20(9):905-13. Epub 2007 Jul 20.

(144). Cui T, Chen Y, Knösel T, Yang L, Zöller K, Galler K, Berndt A, Mihlan M, Zipfel PF, Petersen I. Human complement factor H is a novel diagnostic marker for lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2011 Jul;39(1):161-8. doi: 10.3892/ijo.2011.1010. Epub 2011 Apr 18.

(145). Amornsiripanitch N, Hong S, Campa MJ, Frank MM, Gottlin EB, Patz EF Jr. Complement factor H autoantibodies are associated with early stage NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2010 Jun 15;16(12):3226-31. Epub 2010 Jun 1.

(146). Cheng ZZ, Corey MJ, Pärevalo M, Majno S, Hellwage J, Zipfel PF, Kinders RJ, Raitanen M, Meri S, Jokiranta TS. Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin Chem*. 2005 May;51(5):856-63. Epub 2005 Mar 17.

(147). Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M, Nagel D, Holdenrieder S, Hofmann K, Reiter W, Schmeller N, Stieber P. Measurements of complement factor H-related protein (BTA-TRAK assay) and nuclear matrix protein (NMP22 assay)--useful diagnostic tools in the diagnosis of urinary bladder cancer? *Clin Chem Lab Med*. 2003 Jan;41(1):104-10.

(148). Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, Hautmann SH, Posey JT, Duncan RC, Watson R, Rose L, Markowitz S, Soloway MS. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer*. 2002 Jul 1;95(1):61-72.

Factor H en lavado broncoalveolar y cáncer de pulmón

(149) Charokopos N, Leotsinidis M, Tsiamita M, et al. Increased levels of albumin in bronchial washing fluid of patients with bronchial carcinoma. Could albumin be considered as a tumor marker? *Int J Biol Markers* 2004;19:316-321.

(150) Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, et al. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 1988;133:95-109.

(151) Weis SM. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Hematol* 2008;15:243-249.

(152) Gratton JP, Lin MI, Yu J, et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell* 2003;4:31-39.

(153) Velluti G, Capelli O, Lusuardi M, et al. Bronchoalveolar lavage in the normal lung. First of three parts: protein, enzymatic and ionic features. *Respiration* 1983; 44:403-410.

VIII. APÉNDICES.



Clínica Universitaria

Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
Servicio de Neumología

Teléfonos:
Central 948/ 25 54 00
Admisión 948/ 29 62 92
Fax 948/ 29 65 00
Apartado, 4209
31080 PAMPLONA (España)

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN SOBRE DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE BIOMARCADORES

El cáncer de pulmón es una enfermedad con una alta tasa de incidencia en todo el mundo, constituyendo un problema sanitario de primer orden en nuestro medio. El principal problema a la hora de enfrentarnos a esta enfermedad es la dificultad para diagnosticarla de forma temprana, siendo lo más habitual que se detecte en estadios avanzados del proceso. Teniendo en cuenta que el tratamiento es mucho más eficaz en los primeros momentos de la enfermedad, es muy importante desarrollar nuevas formas de detección precoz, que permitirían una mejora sustancial en las expectativas de los pacientes afectados.

Para ello, el Departamento de Neumología y la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra participan en un proyecto destinado a facilitar y anticipar el diagnóstico del cáncer de pulmón.

El objetivo del presente estudio es desarrollar la tecnología y los procesos adecuados para permitir el diagnóstico y la caracterización de enfermedades tumorales en pulmón mediante análisis proteómicos (expresión de proteínas en las muestras estudiadas) y moleculares.

Para ello es imprescindible utilizar una pequeña parte de las muestras obtenidas en el estudio de los pacientes con alteraciones pulmonares que requieran broncoscopia, tanto tumorales como de otros tipos, para poder comparar ambos grupos.

Las muestras a investigar son: lavado broncoalveolar, suero, esputo y, en los casos de pacientes con tumores visibles endoscópicamente, una biopsia del tumor. Describiremos brevemente cada una de las muestras.

El lavado broncoalveolar consiste en la instilación de suero fisiológico (160 cc) en el árbol bronquial, para posteriormente aspirarlo y examinar su contenido, así como cultivarlo. En caso de participar en el estudio, sólo tras retirar el lavado necesario para los estudios rutinarios se destinará una pequeña parte a fines de investigación (entre 15 y 30 cc). El esputo se obtendrá durante la administración de anestesia local, sin realizar procedimiento adicional alguno.

El suero se extraerá en el mismo momento de la obtención rutinaria de sangre para efectuar el obligatorio estudio de coagulación previo al procedimiento.

En caso de presentar tumor visible, una de las biopsias obtenidas se congelará. Tras asegurar que no es necesaria para el diagnóstico, se utilizará para investigación. En caso de ser necesaria, se destinará al estudio patológico habitual.

Todas las exploraciones se realizarán con la presencia de un patólogo en la sala de bronoscopias, que revisará *in situ* las muestras citológicas.

El objetivo del procedimiento realizado será siempre el estudio de la patología presentada por el paciente. No se realizará ninguna actuación dirigida exclusivamente a investigación, sino que se utilizará una pequeña fracción del material obtenido para el diagnóstico, una vez asegurado que el mismo ha sido alcanzado. Para este fin, las muestras se donarán a la Facultad de Medicina, y serán empleadas únicamente con fines científicos, investigadores y docentes.

Además, el equipo investigador accederá a su historial médico para obtener datos relevantes y poder correlacionarlos con los resultados, que siempre serán confidenciales. Si se utilizaran datos para publicaciones científicas, la identidad del paciente permanecerá oculta.

Los estudios practicados no supondrán en ningún caso coste adicional para el paciente.

Quedamos a su disposición para cualquier aclaración con respecto al presente consentimiento informado.

El paciente podrá revocar en cualquier momento el consentimiento otorgado mediante este documento, si así lo desea.

PACIENTE:
Nº HISTORIA CLINICA:

INVESTIGADOR INFORMANTE:

PACIENTE INFORMADO:

Firma

Firma

Pamplona, a

de

de 200-

VIII.B. Apéndice II: Artículo basado en el presente trabajo

Published OnlineFirst August 27, 2010; DOI:10.1158/1055-9965.EPI-10-0467

Research Article

Cancer
Epidemiology,
Biomarkers
& Prevention

Complement Factor H Is Elevated in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Sputum from Patients with Lung Cancer

Ruben Pio^{1,2}, Javier Garcia³, Leticia Corrales¹, Daniel Ajona¹, Michael Fleischhacker⁶, Maria J. Pajares^{1,4}, Felipe Cardenal⁷, Luis Seijo³, Javier J. Zulueta³, Ernest Nadal⁷, Christian Witt⁶, Maria D. Lozano⁵, Bernd Schmidt⁶, and Luis M. Montuenga^{1,4}

Abstract

Background: Cytologic examination of specimens obtained from the respiratory tract is a lung cancer diagnostic procedure with high specificity but moderate sensitivity. The use of molecular biomarkers may enhance the sensitivity of cytologic examination in the detection of lung cancer.

Methods: Complement factor H, a protein secreted by lung cancer cells, was quantified in a series of bronchoalveolar lavage supernatants from lung cancer patients and patients with nonmalignant respiratory diseases. Albumin, total protein content, and hemoglobin were also analyzed. Results were validated in independent sets of bronchoalveolar lavage and sputum supernatants.

Results: There was a significantly higher concentration of factor H in bronchoalveolar lavage samples from lung cancer patients. The sensitivity and specificity of the factor H test was 82% and 77%, respectively. These results were validated in an independent set of patients with nearly identical results. Furthermore, 70% and 45% of bronchoalveolar lavage fluids from central and peripheral tumors, respectively, reported as cytologically negative, were classified as positive using this marker. Finally, the test was evaluated in a series of sputum supernatants from lung cancer patients and controls. The sensitivity and specificity of the factor H test in this series was 80% and 88%, respectively.

Conclusion: Factor H is elevated in bronchoalveolar lavage and sputum from lung cancer patients.

Impact: Measurement of molecular biomarkers, such as complement factor H, may be used in the future as an adjunct to cytology in the diagnosis of malignant pulmonary diseases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 19(10); 2665–72. ©2010 AACR.

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer death in developed countries (1). In patients with suspected lung cancer, a clear diagnosis is mandatory to determine the treatment strategy. Flexible fiber-optic bronchoscopy is a safe and relatively easy procedure that has proved extremely useful in the diagnosis and management of many pulmonary diseases (2). In fact, bronchoscopy

can be considered as the primary diagnostic tool in patients with suspected centrally located pulmonary carcinoma. Bronchoscopic procedures for the diagnosis of lung cancer include cytologic examination of specimens from bronchial biopsy, bronchial brushing, and bronchial washing/bronchoalveolar lavage. These tests are less invasive than other tissue procurement methods, carry a small risk of complications, and have high specificity. However, sensitivity is relatively low, especially for peripheral lesions that are beyond the visual segmental bronchi (3). It is expected that new approaches, such as the detection of molecular markers, could be used in the future to enhance the sensitivity of cytologic examination in the diagnosis of bronchial fluids. In fact, some molecular markers have already been shown to be differentially increased in bronchial fluids from lung cancer patients. These include proteins such as carcinoembryonic antigen, tumor polypeptide antigen, neurospecific enolase, or telomerase (4–7); cell-free nucleic acids (8–10); chromosome and locus-specific changes (11–14); and epigenetic modifications (15, 16). We have previously reported that complement factor H is expressed and secreted by many non small cell lung cancer (NSCLC) tumors (17). Factor H is an inhibitor of complement

Authors' Affiliations: ¹Division of Oncology, Center for Applied Medical Research; ²Department of Biochemistry, School of Sciences, University of Navarra; ³Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Clínica Universidad de Navarra; ⁴Department of Histology and Pathology, School of Medicine, University of Navarra; ⁵Department of Pathology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; ⁶Medizinische Klinik m.S. Infektologie und Pulmologie (Arbeitsbereich Pneumologische Onkologie) CCM, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany; and ⁷Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, Barcelona, Spain

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention Online (<http://cebp.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Ruben Pio, CIMA-Universidad de Navarra, CIMA Building, Pío XII 55, Pamplona 31008, Spain. Phone: 34-948194700; Fax: 34-948194714. E-mail: rpio@unav.es

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0467

©2010 American Association for Cancer Research.

