

Métodos diagnósticos no invasivos en cáncer pulmonar primario

Primera parte: citología de esputo y radiografía de tórax

Noninvasive diagnostic methods in primary lung cancer

Part one: sputum cytology and chest radiography

Alirio Bastidas⁽¹⁾; Plutarco Garcia Herreros⁽²⁾; Alfredo Saavedra⁽³⁾; Edgar Sánchez⁽³⁾

RESUMEN

El cáncer pulmonar primario es un problema de salud pública a nivel mundial cuyo manejo genera grandes costos económicos en los sistemas de salud y donde su curación sólo se logra con un diagnóstico temprano asociado al manejo quirúrgico oportuno. En la búsqueda de este objetivo en la actualidad se dispone de varios métodos diagnósticos no invasivos entre los que se encuentra la citología de esputo, la radiografía de tórax, la tomografía axial computarizada y la tomografía con emisión de positrones. En el presente artículo, compuesto por dos partes, se discutirá con base a la literatura actual disponible la utilidad de estos métodos diagnósticos como herramientas de tamizaje, diagnóstico, estadiaje y seguimiento en este tipo de neoplasia.

Palabras clave: cáncer de pulmón, citología de esputo, radiografía de tórax, tomografía computarizada, tomografía con emisión de positrones.

ABSTRACT

Primary lung cancer is a world wide public health problem which generates immense costs to the health system and where its cure is only achieved by an early diagnosis associated to an opportune surgical treatment. For this purpose several non invasive diagnostic methods are currently available, among them the sputum cytology, chest radiography, computed tomography scanner and the positron emission tomography. In the present article, constituted by two parts, the usefulness of these diagnostic methods as screening, diagnosis, staging and follow up tools will be discussed on the basis of the current available literature for this type of neoplasm.

Key words: lung cancer, sputum cytology, chest radiography, computed tomography scanner, positron emission tomography.

Rev. Colomb. Neumol. 2008; 20(2): 68-74

INTRODUCCION

Las neoplasias pulmonares se encuentran como la primera causa de muerte por cáncer en el mundo considerándose un problema de salud pública (1); en Estados Unidos se reportaron 213.000 nuevos casos y más de 160.000 muertes por cáncer de pulmón en 2007, siendo la principal causa de muerte por cáncer en este país

(2); en Colombia el cáncer de pulmón se encuentra como la tercera causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta causa en mujeres (3,4), la mayoría de los casos se diagnostican en personas en edades entre los 45 a 75 años (4,5) y el tabaquismo sigue siendo el factor de riesgo más poderoso en la etiología de esta neoplasia, estimándose que hasta un 85% de los cánceres de pulmón son atribuidos a este hábito (6).

(1) Médico Internista - Residente II año Neumología, Hospital Militar Central. Bogotá, Colombia.

(2) Médico, Neumólogo Instituto Nacional de Cancerología – Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

(3) Médico Internista – Neumólogo, Instituto Nacional de Cancerología – Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Correspondencia: *aliriorodrigo@yahoo.com*

Recibido: Mayo 2008. Aceptado: Junio 2008.

Histopatológicamente el cáncer de pulmón puede ser de dos variedades principales que tienen un comportamiento clínico, pronóstico y respuesta al tratamiento diferente: el carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP) en aproximadamente el 20% de los casos y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) en el 80% de los casos (7). De esta última variedad, según datos en Estados Unidos del 20% a 45% corresponden a adenocarcinomas, 25% a 40% al carcinoma escamocelular, 15% a 20% a carcinomas de células grandes y 4% a 5% a adenocarcinoma bronquioloalveolar (7, 8).

El cáncer de pulmón es altamente mortal y sólo alrededor de 15% de los pacientes con este tipo de neoplasia se encuentran vivos 5 años después del diagnóstico (7) y en la actualidad sólo el tratamiento quirúrgico completo en las fases tempranas puede ofrecer una oportunidad de curación (9-11). Por tal motivo hemos querido revisar los métodos diagnósticos no invasivos de utilidad disponibles para el diagnóstico del cáncer de pulmón. Esta revisión se centrará en los conceptos actuales del tamizaje y diagnóstico de la citología de esputo, radiografía de tórax, tomografía axial computarizada de tórax y la tomografía con emisión de positrones.

CITOLOGÍA DE ESPUTO

La citología de esputo ha sido utilizada como método de tamizaje y diagnóstico, en la actualidad, se dispone del método de estudio citológico convencional y los nuevos métodos de evaluación celular mediante inmunohistoquímica, análisis molecular, estudio de metilaciones y citometría de flujo, técnicas que aumentan la sensibilidad en la detección de anomalías celulares tumorales; sin embargo, hasta el momento no existen recomendaciones categóricas de su uso (12).

La utilidad de la citología de esputo la podemos revisar dentro de dos grandes contextos: el primero en el tamizaje del cáncer incluyendo en este grupo los pacientes asintomáticos y en el segundo los pacientes sospechosos por clínica o radiología.

CITOLOGÍA COMO MÉTODO DE TAMIZAJE – PACIENTE ASINTOMÁTICO

Antes de entrar de lleno en el tema debemos recordar que un método de tamizaje se vuelve efectivo cuando cumple con los siguientes requisitos: 1) Alta incidencia y prevalencia de la enfermedad, 2) La prueba debe ser efectiva para detectar la enfermedad en etapas tempranas, 3) Un tratamiento efectivo puede ser realizado en la fase preclínica, 4) La accesibilidad, costo y morbilidad

asociada con la prueba de tamizaje deben ser razonables y 5) Su utilización debe tener impacto sobre la mortalidad y no sobre la sobrevida (13-16).

Si bien la citología de esputo puede ser un método accesible para la evaluación de una enfermedad frecuente como el cáncer de pulmón, su efectividad es variable (17, 18). Debemos considerar que la utilidad de la citología de esputo es totalmente dependiente de la habilidad para la recolección de una muestra adecuada que incluya células del tracto respiratorio inferior y que muchos de los pacientes evaluados se encontrarán asintomáticos; la muestra puede ser obtenida mediante la inducción de esputo con solución salina hipertónica, uridina trifosfato, percusión, vibración y oscilación de alta frecuencia, que mejora el rendimiento de la prueba, en pequeños porcentajes; no hay evidencia fuerte que recomiende su utilización actual (19, 20).

La sensibilidad reportada de la citología de esputo es menor al 20% para la detección del cáncer pulmonar (21). Esta varía dependiendo del tipo de tumor, localización y tamaño, siendo mayor en el cáncer escamocelular, tumores de localización central o en los lóbulos inferiores mayores de 2 centímetros; disminuye en el adenocarcinoma, cánceres periféricos y pequeños donde sólo se detecta en un 7% (22).

El estudio cooperativo de la detección temprana de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, realizado en 3 hospitales (Clínica Mayo, Johns Hopkins y Memorial Sloan-Kettering) en la década del 70, evaluó como punto final la mortalidad, utilizando la radiografía de tórax anual (control) con la utilización de radiografía de tórax y citología (intervención) cada 4 meses y encontró que la sobrevida a 5 años para cáncer pulmonar en el grupo de intervención fue del 40% y en el grupo control de 15%; sin embargo, no se encontró diferencia en la mortalidad por cáncer pulmonar (23-29), situación que puede estar en relación al comportamiento biológico variable de la neoplasia y las comorbilidades existentes en estos pacientes (30).

Se debe tener en cuenta que cuando se evalúan pacientes de alto riesgo para cáncer pulmonar, tales como: sexo masculino, grupo de edad entre 55 y 65 años, antecedente de tabaquismo pesado usualmente mayor de 20 paquetes año e historia de cáncer aéreo digestivo, el rendimiento de la citología aumenta; en el estudio cooperativo aproximadamente el 0,2% de las muestras fue positiva para carcinoma y de estos la mitad de los casos tenía radiografía negativa. Otro 0,2% mostraba atipia severa y entre el 0,2% al 3% atipia moderada en grupos de alto riesgo (23-25). En el estudio conducido en Checoslovaquia, donde se incluían

pacientes de alto riesgo y cuya intervención consistía en radiografía de tórax y citología de esputo cada 6 meses, comparada con un grupo control que tenía radiografía de tórax y citología de esputo por otro estudio de tamizaje 3 años antes, seguidos por un periodo de 3 años, se mostró un incremento significativo en el número de cánceres detectados en el grupo de intervención; sin embargo, al igual que en estudios previos no se halló diferencia en la mortalidad (31-33).

En 1993, el Programa Especializado de la Universidad de Colorado en Búsqueda Excelencia (SPORE) en cáncer pulmonar realizó un estudio de cohortes; se siguió el desarrollo de cáncer pulmonar y utilización de biomarcadores y quimioprevención donde los criterios de inclusión utilizados fueron una historia de tabaquismo de al menos 40 paquetes año y obstrucción del flujo aéreo definido como un FEV1 menor de 70% y una relación FEV1/FVC menor del 70%; donde el 84% de los participantes tenía una recolección de esputo adecuado para la interpretación citológica, el diagnóstico de cáncer se obtuvo en 1,7% de los participantes mostrando un significativo incremento en el grupo de alto riesgo. Adicionalmente en un 0,8% se diagnosticó displasia severa, comparada con un 0,04% del estudio cooperativo (34, 23-25). Situación que posiblemente convierte a la citología de esputo anormal como un biomarcador de riesgo para la aparición de cáncer según el grado de severidad encontrada (35, 36). El SPORE encontró que el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar ajustado a la edad, género y estado de consumo de cigarrillo se incrementa con los diferentes grados de atipia citológica así: normal 1%, atipia leve 1,1%, moderada 1,68%, moderada o severa 3,18% y 31,4% en severa (34, 37, 38).

Por otra parte, en los pacientes de alto riesgo con citología y atipia se ha querido complementar con métodos invasivos como la fibrobroncoscopia fluorescente, aumentando el número de aislamientos en el diagnóstico de cáncer pulmonar; sin embargo no hay datos que influyan en la mortalidad y los altos costos limitan su implementación (39-42).

CITOLOGÍA DE ESPUTO Y NUEVOS MÉTODOS BIOMOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE CÁNCER PULMONAR

Inmunohistoquímica

En dos estudios prospectivos de la ribonucleoproteína nuclear hnRNP A2/B1 se encontró una sensibilidad del 82% y especificidad del 65%, entre mineros que puede ser útil como una herramienta de tamizaje; sin embargo la prueba no es cuantitativa, lo cual hasta el momento no ha podido definir un umbral de decisión (43, 44).

Análisis molecular

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) la cual se utiliza para la detección de mutaciones de los genes K-ras y p53 en el esputo de los pacientes con cáncer (45,46,47) no ha mostrado ser de utilidad ya que estas alteraciones se pueden encontrar en pacientes fumadores sin cáncer pulmonar (48, 49); además, no existen actualmente estudios a largo plazo que determinen el riesgo de cáncer pulmonar, si una o más de estas mutaciones se encuentran (50). Por otra parte, existe una gran variedad de mutaciones en el cáncer pulmonar, lo que limita aún más la prueba, requiriéndose la búsqueda de múltiples marcadores para la detección temprana del cáncer pulmonar (51).

Metilación aberrante de promotores

El inicio del cáncer se acompaña por la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores. Dicha inactivación requiere de la pérdida de ambos alelos en los genes, pero algunos inactivadores, como el p53, requieren usualmente una combinación de mutaciones puntuales y pérdida de alelos (52). Sin embargo, la metilación aberrante de regiones promotoras de muchos genes es el mayor mecanismo de inactivación de genes supresores de cáncer en humanos (52, 53). Es frecuente una combinación de metilación de un alelo, acompañada por la pérdida del otro. Encontrar las secuencias metiladas en el esputo en fumadores pesados puede predecir el riesgo de cáncer pulmonar (54).

Aunque la detección de la metilación de los genes en células del esputo es una aproximación promisoría (55), sólo entre 40% a 60% de las muestras de esputo examinadas muestran algún cambio de metilación en pacientes con tumores y no todos los tumores tienen cambios de metilación (56-58), siendo, posiblemente necesario el uso de varios marcadores de la metilación para aumentar la sensibilidad y especificidad (59-61).

Citometría de flujo en células de esputo

Los cambios morfológicos de las células en el esputo asociados a malignidad (MACs) pueden ser utilizados como herramientas en la detección de cáncer temprano. Los MACs referidos como cambios no obvios debidos a una distribución del ADN en el núcleo de células normales, por la presencia de cáncer pre invasivo o invasivo en la vecindad, pueden ser cuantificados por análisis de imágenes asistidas por computador. Entre 5.000 y 15.000 núcleos celulares son recolectados en cada muestra y las propiedades de cada imagen nuclear son estudiadas en más de 114 características que describen la morfometría, fotometría y propiedades texturales de cada núcleo. Los núcleos son agrupados en varias categorías, para finalmente

diferenciar las células anormales (62, 63). En el análisis retrospectivo de los datos recolectados del estudio en la Clínica Mayo, los MACs se identificaron correctamente en 74% de los sujetos que desarrollaron cáncer de pulmón y la presencia de MACs precedía el desarrollo de cáncer en los próximos 12 meses o más. La sensibilidad de la citometría está entre 70% y 80%, con una especificidad de 90% para los estados 0 y I incluidos adenocarcinomas periféricos. La ventaja de este método es que no depende de la presencia de células malignas en el esputo, aunque la presencia de atipia o células malignas mejora la sensibilidad (63-65).

CITOLOGÍA DE ESPUTO COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO EN EL PACIENTE SINTOMÁTICO O CON RADIOGRAFÍA ANORMAL

En los pacientes con síntomas de enfermedad neoplásica e imágenes radiológicas anormales, la citología de esputo es superada en rendimiento diagnóstico por otros métodos como la fibrobroncoscopia con lavado y biopsia transbronquial y la aspiración con aguja guiada imagenológicamente (66-74).

En estudios en nódulo pulmonar la citología de esputo no es costo efectiva, excepto en pacientes con lesiones grandes no resecables. Sin embargo, hay resultados contradictorios donde la citología de esputo pareciera tener costo efectividad en el diagnóstico de nódulos periféricos si la probabilidad preprueba para cáncer es menor del 50% (44, 75).

Finalmente debemos considerar que la citología del esputo puede ser la única herramienta diagnóstica en el paciente gravemente enfermo que, por su condición clínica, no tolere procedimientos invasivos y donde el diagnóstico sería importante para enfocar procedimientos paliativos específicos (76).

RADIOGRAFÍA DE TÓRAX

La utilidad de la radiografía de tórax en el diagnóstico del cáncer pulmonar se puede abordar dentro de dos contextos clínicos: primero, en el paciente asintomático como tamizaje, con o sin factores de riesgo para cáncer pulmonar y segundo, en los pacientes con sintomatología respiratoria sospechosa de cáncer pulmonar.

RADIOGRAFÍA DE TÓRAX COMO MÉTODO DE TAMIZAJE – PACIENTE ASINTOMÁTICO

La radiografía de tórax fue la primera prueba de tamizaje utilizada para cáncer pulmonar en la década de los cincuenta, donde 55.034 hombres fueron aleatorizados para realizar radiografía de tórax con dos

proyecciones cada 6 meses por 3 años y una radiografía de tórax al inicio y final del periodo de 3 años (control); se encontraron 132 vs 96 casos de cáncer pulmonar en la intervención y en el grupo control respectivamente, sin embargo fallecieron 62 pacientes en el grupo de intervención y 59 en el control con una mortalidad similar (77,78).

En la década de 1970, el Instituto Nacional de Cancerología de Estados Unidos llevó a cabo 3 estudios clínicos controlados para evaluar la radiografía y la citología de esputo para el tamizaje de cáncer pulmonar, los estudios fueron realizados en la Clínica Mayo, el Hospital Johns Hopkins y el Memorial Sloan-Kettering (79,80). El resultado primario de los tres estudios fue mortalidad, aproximadamente 10.000 hombres y mujeres fumadoras fueron incluidos en cada lugar. La intervención en los tres estudios era la realización de la citología de esputo y radiografía de tórax cada 4 meses en el Johns Hopkins y el Memorial Sloan-Kettering y cada 6 en la Clínica Mayo (intervención), comparada con la toma anual de radiografía (control). Ninguno de los tres estudios demostró beneficios en la mortalidad (80,81) y a pesar de las limitaciones de los estudios, que incluían una contaminación cruzada, no se pudo concluir que los resultados finales eran el resultado de fallas metodológicas.

Al igual que en la citología de esputo, la radiografía de tórax aumenta el rendimiento diagnóstico en pacientes de alto riesgo. En 1992, el estudio de Cáncer de Próstata, Pulmón, Colorectal y Ovario (PLCO) estudio la radiografía de tórax como un prueba de tamizaje para el cáncer pulmonar. El PLCO coordinado por el Instituto Nacional de Cancerología de Estados Unidos, aleatorizó a 154.942 participantes entre los 55 y 74 años. 77.477 individuos no fueron tamizados y a los restantes 77.465 se les realizó una placa de tórax y tres tomas anuales si eran fumadores o tenían antecedente de tabaquismo, si no tenían historia de tabaquismo 2 tomas anuales. Se encontró mayor frecuencia de cáncer a través del método radiológico en los fumadores y quienes tenían historia de tabaquismo en los últimos 15 años. Un 44% de los cánceres se diagnóstico en estadio I, sin embargo, a pesar de una mayor detección temprana no se encontró disminución en la mortalidad (82).

RADIOGRAFÍA DE TÓRAX EN EL PACIENTE SINTOMÁTICO CON SOSPECHA DE CÁNCER PULMONAR

En este contexto la radiografía de tórax se convierte en la aproximación inicial fundamental para la evaluación del paciente con sospecha de cáncer pulmonar. Deben realizarse en todos los casos dos proyeccio-

nes y evaluarse todos los sitios donde las alteraciones pulmonares pueden pasar inadvertidas como los hilios, el mediastino, la pleura y la posición del diafragma (83, 84).

La imagen más sugestiva de cáncer en la radiografía de tórax es la de masa pulmonar, una lesión de 3 o más centímetros de diámetro, generalmente redondeada y rodeada de parénquima sano (85). Otros hallazgos sugestivos son las atelectasias persistentes, la neumonía de lenta resolución, en la cual se observa un infiltrado pulmonar persistente (más de 4 a 6 semanas), el nódulo pulmonar solitario, el ensanchamiento mediastinal, el derrame pleural unilateral y la elevación diafragmática unilateral (83, 86).

La sensibilidad de la radiografía de tórax está estimada en menos del 50% y la especificidad alrededor del 89%. La sensibilidad de la radiografía varía por muchos factores entre los que se encuentran: el tamaño, la localización de la lesión y los problemas relacionados con la calidad de la imagen y la habilidad del médico que interpreta el estudio; es raro que el cáncer pulmonar sea identificado con la radiografía de tórax cuando es menor de 1 cm de diámetro (87) y 85% de los cánceres no detectados en la radiografía de tórax comparten la característica de ser periféricos, menores de 2 centímetros, con baja densidad y ubicados en áreas anatómicas de sobre posición (88).

Si una lesión sospechosa es identificada, es importante la comparación con radiografías previas. Si la lesión ya se encontraba presente y no ha presentado cambios con un intervalo de 2 años se puede presumir como benigna (89, 90).

En circunstancias en las que no se puedan comparar estudios previos, la tomografía computarizada (CT) usualmente ayuda para caracterizar la lesión (91).

La radiografía de tórax tiene valor en ayudar a la estadificación del cáncer pulmonar y su seguimiento, sin embargo es ampliamente superada en precisión por la tomografía computarizada y tomografía con emisión de positrones.

CONCLUSIONES

En el momento, la técnica tradicional utilizada para la realización de la citología de esputo no ha mostrado ser una herramienta útil como método de tamizaje en la detección de cáncer pulmonar, tanto en la población general como en los pacientes de alto riesgo; sin embargo, la utilización de las nuevas técnicas biomoleculares podría tener un papel en el futuro para la detección temprana de esta neoplasia. En cuanto al diagnóstico del cáncer en el paciente sintomático o

con radiografía anormal, se deben utilizar las técnicas disponibles actualmente que ofrecen un mayor rendimiento como la fibrobroncoscopia o la aspiración con aguja. No obstante, se debe tener en cuenta que puede ser una herramienta útil en el diagnóstico de masas y nódulos pulmonares sospechosos cuando no se puedan realizar los estudios invasivos por las condiciones del paciente. Por otra parte, la radiografía de tórax con los datos actuales no se puede recomendar como método de tamizaje en pacientes con y sin riesgo para cáncer pulmonar. En cuanto al paciente con sintomatología y sospecha de neoplasia, la radiografía de tórax es el método diagnóstico inicial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Greenlee RT, Murria T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
3. Instituto Nacional de Cancerología, Incidencia estimada por cáncer en Colombia 1995-1999, Impresión 2005.
4. Instituto Nacional de Cancerología, Anuario Estadístico 2006, Volumen 4; Impresión Noviembre 2007.
5. Piñeros M, Murilo RH. Incidencia de cáncer en Colombia Importancia de las Fuentes de Información en la Obtención de Cifras Estimadas, *Revista Colombiana de Cancerología* 8(1): 5-14.
6. Shopland DR, Eyre HJ, Pechacek TF. Smoking attributable cancer mortality in 1991: is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1142-1148.
7. Jernal A, Tiwari RC, Murria T. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
8. Lee P, Forey B. Why are lung cancer rate trends so different in the United States and United Kingdom? *Inhalation Toxicology* 2003; 15: 909-949.
9. Flehinger BJ, Kimmel M, Nelamed MR. The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *Chest* 1992; 101: 1013-1018.
10. Henschke CI, Wisnivesky JP, Yankelevitz DF, Miettinen OS. Small stage I cancers of the lung: genuineness and curability. *Lung Cancer* 2003; 39: 327-330.
11. Brett GZ. Earlier diagnosis and survival in lung cancer. *BMJ* 1969; 4: 260-2.
12. Artinian V, Kvale P. Update in screening of lung cancer, *Respirology* 2005; 10: 558-566.
13. Hulka BS. Cancer screening. Degree of proof and practical application. *Cancer* 1988; 62: 1776-1780.
14. Black WC, Welch HG. Screening for disease. *Am J Roentgenol* 1997; 168: 3-11.
15. Clark R, Reingtgen D. Principles of screening. In: Reigtge D, Clark R. *Cancer Screening*. St. Louis, MO: Mosby; 1996. p. 1-20.
16. US Department of Health and Human Services (US DHHS). National Lung Cancer Screening Trial – What is the appropriate measure of screening effectiveness? Disponible en: <http://www.cancer.gov/nlst/what-is-nlst>.

17. Rosa UW, Prolla JC, Gastal ES. Cytology in diagnosis of cancer affecting the lung. Result in 1000 consecutive patients. *Chest* 1973; 63: 203-207.
18. Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography. An update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004; 140: 740-53.
19. Kennedy TC, Proudfoot SP, Piantadosi S, et al. Efficacy of two sputum collection techniques in patients with air flow obstruction. *Acta Cytol* 1999; 43: 630-636.
20. Johnson FL, Donohue JF, Shaffer CL. Improved sputum expectoration following a single dose of INS316 in patients with chronic bronchitis. *Chest* 2002; 122: 2021-2029.
21. Murria K, Dubai E, Salter D, Monaghan H. Efficacy and pattern of use of sputum cytology as a diagnostic test. *Cytopathology* 2002; 13: 350-354.
22. Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H, et al. Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. *Radiology* 1996; 201: 798-802.
23. Frost JK, Ball WC, Levin ML, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins Study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:549-54.
24. Flehinger BJ, Melamed MR, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WB, Martini N. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Memorial Sloan-Kettering Study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:555-60.
25. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic Study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 561-5.
26. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB. Screening for early lung cancer: results of the Memorial Sloan-Kettering Study in New York. *Chest* 1984; 86: 44-53.
27. Tuckman MS. Survival and mortality from lung cancer in a screened population: the Johns Hopkins study. *Chest* 1986; 89: 325S-6S.
28. Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR. Lung cancer screening: the Mayo Program. *J Occup Med* 1986;28:746-50.
29. Marcus PM, Bergstralh EJ, Fagerstrom RM, et al. Lung cancer mortality in the Mayo Lung Project: impact of extended follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1308-16.
30. Extermann M. Measuring comorbidity in older cancer patients. *Eur J Cancer* 2000; 36: 453-71.
31. Kubik A, Polak J. Lung cancer detection results of a randomized prospective study in zechoslovakia. *Cancer* 1986; 57: 2427-37.
32. Wilde J. A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR. *Eur Respir J* 1989;2:656-62.
33. Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, McCrory DC. Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest* 2003; 123: 72S-82S.
34. Hirsch FR, Prindiville SA, Byers T, et al. Sputum cytology as a marker of risk for lung cancer—preliminary results from the University of Colorado high-risk cohort study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21(301a) [abstract 1201].
35. Saccomanno G, Saunders RP, Archer VE, et al. Cancer of the lung: the cytology of sputum prior to the development of carcinoma. *Acta Cytol* 1965;9:413-423.
36. Saccomanno G, Archer VE, Auerbach O, et al. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 1974; 33: 256-270.
37. Risse EK, Vooijs GP, van't Hof MA. Diagnostic significance of «severe dysplasia» in sputum cytology. *Acta Cytol* 1988; 32: 629-634.
38. Prindiville SA, Byers T, Hirsch FR, et al. Sputum cytological atypia as a predictor of incident lung cancer in a cohort of heavy smokers with airflow obstruction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 987-993.
39. McWilliams A, Lam S. The utilization of autofluorescence in flexible bronchoscopy. In: Wang KP, Mehta AC, Turner JF, eds. *Flexible Bronchoscopy*, 2nd ed. Boston: Blackwell Science, 2004. p. 138-145.
40. Hirsch FR, Prindiville SA, Miller YE, et al. Fluorescence versus white-light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1385-1391.
41. Sato M, Sakurada A, Sagawa M, et al. Diagnostic results before and after introduction of autofluorescence bronchoscopy in patients suspected of having lung cancer detected by sputum cytology in lung cancer mass screening. *Lung Cancer* 2001; 32: 247-253.
42. Moro-Sibilot D, Jeanmart M, Lantuejoul S, et al. Cigarette smoking, preinvasive bronchial lesions, and autofluorescence bronchoscopy. *Chest* 2002; 122: 1902-1908.
43. Tockman MS, Gupta PK, Myers JD, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1685-1693.
44. Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S, et al. Prospective detection of preclinical lung cancer: results from the studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2237-46.
45. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1634-1637.
46. Yakubovskaya MS, Spiegelman V, Luo FC, et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995; 63: 810-814.
47. Mao L, Lee JS, Kurie JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:857-862.
48. Wistuba II, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1366-1373.
49. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
50. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-9.
51. Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004;108:91-6.
52. Wistuba II, Berhens C, Virmani AK, et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 1973-9.

53. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:687-692.
54. Tsou J, Hagen J, Carpenter C, Offringa L, DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; 21: 5450-5461.
55. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902-8.
56. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, et al. DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 2001;1:61-67.
57. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-255.
58. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Heman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumour suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70.
59. Valle RP, Chavany C, Zhukov TA, Jendoubi M. New approaches for biomarker discovery in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3: 55-67.
60. Tockman MS, Erozan YS, Gupta P, et al. The early detection of second primary lung cancers by sputum immunostaining. LCEWDG Investigators. Lung Cancer Early Detection Group. *Chest* 1994; 106(6 Suppl): 385S-390S.
61. Wang Y, Hsu HS, Chen TP, Chen JT, Molecular diagnostic Markers for Lung Cancer in Sputum and Plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 179-184.
62. Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A, et al. Sputum screening by quantitative microscopy: a reexamination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Study. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 697-704.
63. Palcic B, Garner DM, Beveridge J, et al. Increase of sensitivity of sputum cytology using high-resolution image cytometry: field study results. *Cytometry* 2002;50:168-176.
64. McWilliams A, Mayo J, McDonal S, et al. An Alternative Approach to Lung Cancer Screening. Oral Sessions/Signaling and Pathways, S41.
65. Xing S, Khanavkar B, Nakhosteen JA, Atay Z, Jöckel K, Marek W, Predictive Value of Image Cytometry for Diagnosis of Lung Cancer in Heavy Smokers. *Eur Resp J* 2005; (25)6: 956-963.
66. Collins L, Haines C, Perkel R, Enck R, Lung Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Phys* 2007; 75 (1): 57-63.
67. Checiani V. Bronchoscopic diagnosis of solitary pulmonary nodules and lung masses in the absence of endobronchial abnormality. *Chest* 1996; 109: 620-625.
68. Mehta AC, Kathawalla SA, Chan CC, Arroliga A. Role of bronchoscopy in the evaluation of solitary pulmonary nodule. *J Bronchoscopy* 1995; 2: 315-321.
69. Cortese DA, McDougall JC. Biopsy and brushing of peripheral lung cancer with fluoroscopic guidance. *Chest* 1979; 75: 141-145.
70. Wallace JM, Deutsch AL. Flexible fiberoptic bronchoscopy and percutaneous needle lung aspiration for evaluating the solitary pulmonary nodule. *Chest* 1982; 81: 665-671.
71. Stringfield JT, Markowitz DJ, Bentz RR, et al. The effect of tumor size and location on diagnosis by fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 1977; 72: 474-476.
72. Pirozynski M. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral lung cancer. *Chest* 1992; 102: 372-374.
73. Shiner RJ, Rosenman J, Katz I, et al. A bronchoscopic evaluation of peripheral lung tumors. *Thorax* 1988; 43: 867-889.
74. Wang KP, Haponik EF, James Britt E, et al. Transbronchial needle aspiration of peripheral pulmonary nodules. *Chest* 1984; 86: 819-823.
75. Raab SS, Hornberger J, Raffin T. The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effective analysis. *Chest* 1997; 112(4): 937-945.
76. Passero M. Techniques for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancer of the Lung: From Molecular Biology to Treatment Guidelines*. 2002. Chapter 5. p 135.
77. Brett GZ. The value of lung cancer detection by six-monthly chest radiographs. *Thorax* 1968;23:414-20.
78. Brett GZ. Earlier diagnosis and survival in lung cancer. *BMJ* 1969;4:260-2.
79. Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB. Lung cancer screening: the Mayo Lung cancer program. *J Occup Med* 1986; 28: 746-750.
80. Tockman MS. Lung cancer screening: The Johns Hopkins Study 1986; 89 (suppl): 324.
81. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB. Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest* 1984; 86: 44-53.
82. Gohagan JK, Prorok PC, Hayes RB, The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial of the National Cancer Institute: history, organization, and status. *Control Clin Trials* 2000; 21(suppl 6): 251S-272S.
83. Gomersall L, Olson S. Imaging in lung cancer. *Imaging* 2004; 16:1.
84. Goldmeir E. Limits of visibility of bronchogenic carcinoma. *Am Rev Respir Dis* 1965; 91: 232.
85. Theros E. Varying manifestations of peripheral pulmonary neoplasms: a radiologic-pathologic correlative study. *Am J Roentgenol* 1977; 128: 893.
86. Kundel HL. Predictive value and threshold detectability of lung tumors. *Radiology* 1981; 139: 25.
87. Muhm JR, Miller WE, Fontana RS, Sanderson DR, Uhlenhopp MA, Lung cancer detected during a screening program using four-month chest radiographs. *Radiology* 1983; 148: 609.
88. Woodring J. Pitfalls in the radiologic diagnosis of lung cancer. *Am J Roentgenol* 1990; 154:609.
89. Good C, Wilson T. The solitary circumscribed pulmonary nodule. *JAMA* 1958; 166:210.
90. Yankelevitz D, Henschke C. Does 2-year stability imply pulmonary nodules are benign? *Am J Roentgenol* 1997; 168: 325.
91. Patz EF, Jr. Imaging bronchogenic carcinoma. *Chest* 2000; 117: 90, 23.