

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANALISIS DE MARCADORES MOLECULARES
ASOCIADOS A CANCER PULMONAR DE CELULAS
PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MEXICO**

POR

M.C.P. NANCY ELENA GUZMAN DELGADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

MARZO DE 2002

TC

RC

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

TC

RC

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

TC

RC

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

TC

RC

280

280

280

280

280

280

280

280

280

280

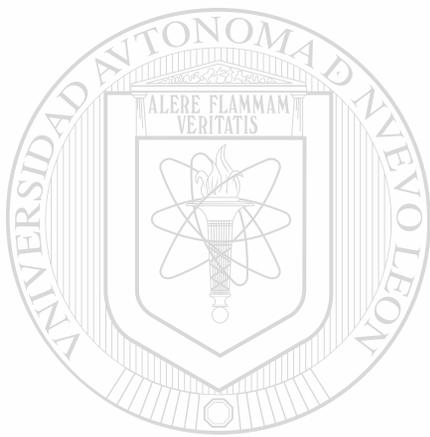
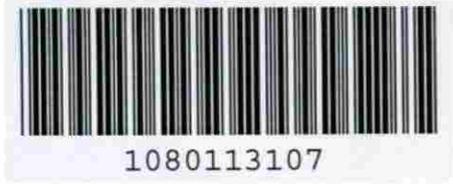
280

280

280

280

280



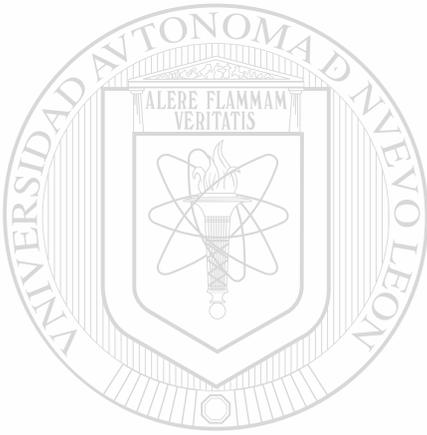
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

231857



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

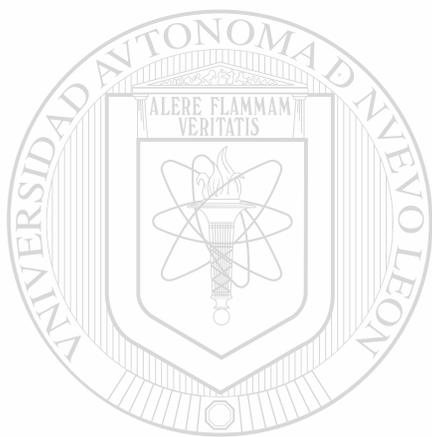
TM

RC 280

.L8

C8

c 1

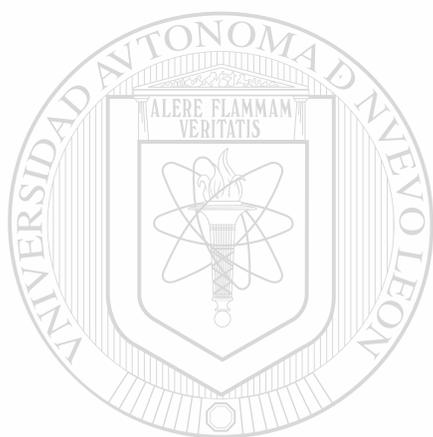


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

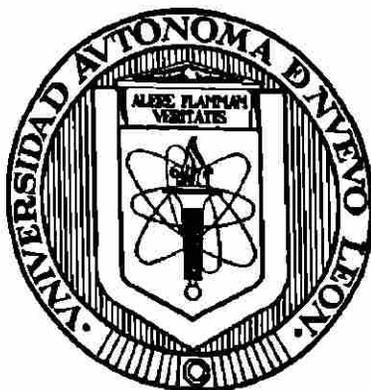


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES
ASOCIADOS A CÁNCER PULMONAR DE CÉLULAS
PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MÉXICO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C.P. NANCY ELENA GUZMÁN DELGADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

Marzo, 2002

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dr. Augusto Rojas, Dr. Decanini y Dr. Hugo A. Barrera por sus consejos, su paciencia y sus acertadas observaciones en este trabajo.

A las Dra. Herminia Martínez, Dra. Agnés Revol y a la Dra. Rocío Ortiz, quienes desinteresadamente siempre me apoyaron en todo momento.

Al Departamento de Patología de la clínica #34 del IMSS, especialmente a Carmelita, Lucy, Bety, Fernando, Adriana y Silvia por su gran disponibilidad en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación (grupo de los 12): Malena, Lety Aurelio, Prisco, Polo, Lulú, Clarisa, Virgilio, Sergio, Itzel y Mauricio. Por su amistad y ayuda durante toda la maestría.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

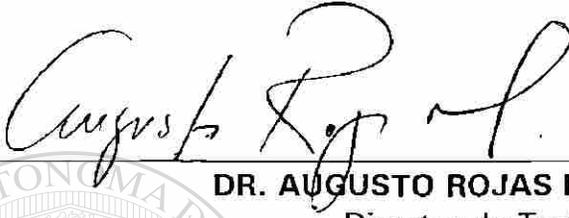
®

Al departamento de bioquímica principalmente a Lolita, Andrés y a mis compañeros de laboratorio (Pablo, Irma, Sandra, Eddy, Iram e Iván) por su paciencia y contribución de alguna manera en en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos en especial a Pilar y Malena que siempre estuvieron en los momentos más difíciles y que me brindaron su cariño y amistad.

**ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A CÁNCER
PULMONAR DE CELULAS PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación de la Tesis:



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis



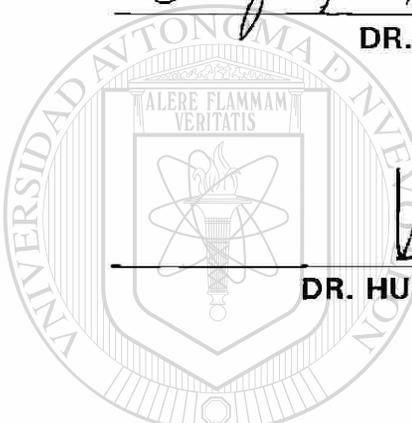
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Co-Director de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
NOMENCLATURA	
RESUMEN	

I.-INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del cáncer pulmonar.	1
1.1.1 Cáncer pulmonar.	1
1.1.2 Morbilidad y mortalidad.	1
1.1.3 Clasificación histológica e histogénesis del CPCP.	2
1.1.4 Factores de riesgo.	3
1.1.5 Cuadro clínico, pronóstico y tratamiento.	5
1.1.6 Marcadores de respuesta biológica en el CPCP.	7

ANTECEDENTES

1.2 Carcinogénesis.	8
1.3 Predisposición genética y marcadores moleculares.	8
1.3.1 Alteraciones cromosómicas.	9
1.3.2 Oncogenes asociados a CPCP.	10
1.3.3 Genes supresores de tumor asociados a CPCP.	11
1.3.4 Marcadores de proliferación y diferenciación celular en el CPCP.	14

1.3.5 Implicaciones clínicas y terapéuticas de los biomarcadores .	15
1.3. 6 p53 y terapia génica.	16

II.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación.	17
2.2 Objetivos.	17
2.2.1 Objetivo general.	17
2.2.2 Objetivos específicos.	18

III.-ESTRATEGIA GENERAL

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo, origen de los reactivos y equipo.	21
4.1.1 Área de trabajo.	21
4.1.2 Material biológico.	21
4.1.3 Reactivos químicos.	22
4.1.4 Material.	23
4.1.5 Equipo.	23
4.1.6 Apoyo computacional.	24
4.2 Métodos.	25
4.2.1 Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.	25
4.2.2 Análisis histopatológico.	26
4.2.2.1 Tinción de hematoxilina y eosina.	26
4.2.2 Análisis inmunohistoquímico.	27
4.2.3.1 Preparación de portaobjetos.	27
4.2.3.2 Procedimiento de inmunohistoquímica	28
4.2.4 Análisis molecular.	29
4.2.4.1 Extracción de ADN genómico a partir de muestras embebidas en parafina.	30

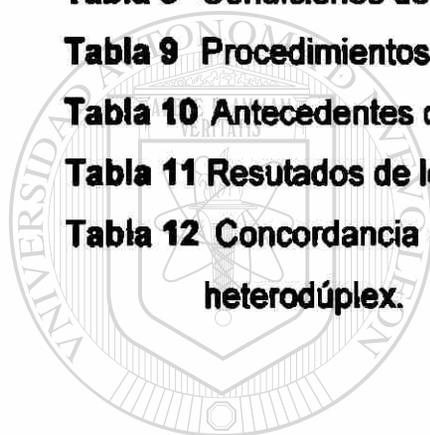
4.2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.	31
4.2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa para los exones 5-8 de p53.	32
4.2.4.4 Análisis de los productos amplificados.	34
4.2.4.5 Análisis de mutaciones mediante heterodúplex.	35
4.2.4.6 Purificación del producto amplificado.	37
4.2.4.7 Secuenciación.	39

V.-RESULTADOS

5.1 Datos epidemiológicos.	40
5.2 Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CPCP.	41
5.3 Análisis inmunohistoquímico.	42
5.3.1 Expresión de ACTH.	42
5.3.2 Expresión de enolasa neuronal específica.	42
5.3.3 Expresión de cromogranina.	43
5.3.4 Expresión de citoqueratinas.	44
5.3.5 Expresión de c-myc.	44
5.3.6 Expresión de p53.	45 [®]
5.4 Análisis molecular.	45
5.4.1 Extracción del ADN a partir de muestras embebidas en parafina.	45
5.4.2 Análisis de mutaciones por PCR-heterodúplex.	46
5.4.2.1 Análisis del exón 5 de p53.	47
5.4.2.2 Análisis del exón 6 de p53.	47
5.4.2.3 Análisis del exón 7 de p53.	48
5.4.2.4 Análisis del exón 8 de p53.	49
5.4.3 Resultados del análisis del gen p53 y sus características clínicas.	51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Morbilidad de cáncer pulmonar.	2
Tabla 2 Clasificación histológica del cáncer pulmonar.	3
Tabla 3 Biomarcadores en el CPCP.	7
Tabla 4 Principales oncogenes en el CPCP y su frecuencia.	10
Tabla 5 Sitio de mutaciones reportadas para el gen p53 en CPCP.	13
Tabla 6 Iniciadores para cada exón y sus características.	33
Tabla 7 Condiciones de reacción de la PCR para los exones 5-8.	33
Tabla 8 Condiciones del programa del termociclador.	34
Tabla 9 Procedimientos de obtención de las muestras.	41
Tabla 10 Antecedentes de exposición a tabaquismo.	42
Tabla 11 Resultados de los casos de CPCP.	51
Tabla 12 Concordancia de los métodos de inmunohistoquímica y PCR-heterodúplex.	52



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

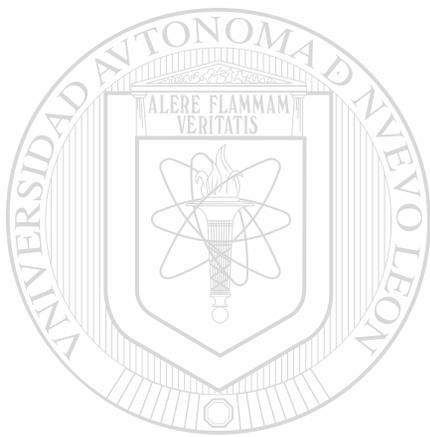
LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Factores de riesgo de CP.	4
Figura 2. Cuadro clínico.	5
Figura 3. Métodos de tratamiento para CP.	6
Figura 4. Características de p53.	12
Figura 5. Estrategia experimental.	20
Figura 6. Heterodúplex.	35
Figura 7. Método de purificación.	38
Figura 8. Características histológicas de CPCP subtipo avicular.	41
Figura 9. Expresión de ACTH.	42
Figura 10. Expresión de enolasa neuronal específica.	43
Figura 11. Expresión de cromogranina.	43
Figura 12. Expresión de citoqueratinas de alto y bajo PM.	44
Figura 13. Expresión de c-myc.	44
Figura 14. Expresión de p53.	45
Figura 15. Análisis de ADNs.	46
Figura 16. Análisis del exón 5 del gen p53.	47
Figura 17. Análisis del exón 6 de p53.	48
Figura 18. Análisis del exón 7 de p53.	49
Figura 19. Análisis del exón 8 de p53.	50
Figura 20. Frecuencia de variantes del gen p53.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermophylus aquaticus</i>
BAAF	Biopsia por aspiración con aguja fina
p	Brazo corto de un cromosoma
q	Brazo largo de un cromosoma
CP	Cáncer pulmonar
CPCP	Cáncer pulmonar de células pequeñas
CPCNP	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Hora
hrs	Horas
ACTH	Homona adenocorticotrópica
IHQ	Inmunohistoquímica
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases

LOH	Pérdida de heterocigocidad
PM	Peso molecular
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable
rpm	Revoluciones por minuto
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleósidos
X	Veces la concentración
V	Voltios
Vol	Volúmen



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Nancy Elena Guzmán Delgado
Fecha de graduación: Marzo, 2002
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: "ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A CÁNCER PULMONAR DE CÉLULAS PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MÉXICO"

Número de páginas: 74

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

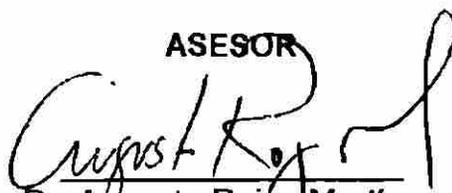
Área de estudio: Diagnóstico Molecular

Propósito y Método de estudio: La identificación de las alteraciones moleculares asociadas al cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) tiene gran importancia clínica, considerando que algunos de estos marcadores moleculares (oncogenes y genes supresores de tumor) y de diferenciación celular están involucrados en la patología, en la determinación de la sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia y en el pronóstico de la enfermedad.

En este trabajo se analizaron 50 muestras de tejido pulmonar embebido en parafina, de pacientes afectados por otras patologías (grupo control) y 42 muestras problema con CPCP, divididos de acuerdo a su tipo histológico, en adenocarcinomas (n=27), tipo intermedio (n=6) y tipo mixto (n=9). Cada muestra embebida en parafina se dividió en dos porciones para el análisis inmunohistoquímico (ACTH, enolasa, cromogranina, citoqueratinas, c-myc y p53) y para el análisis molecular de los exones 5 al 8 del gen p53 por la técnica de PCR heterodúplex.

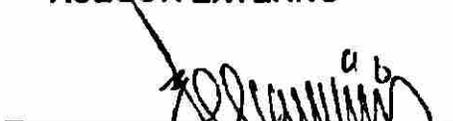
Contribuciones y Conclusiones: Los hallazgos sobre los marcadores analizados por inmunohistoquímica en las muestras con CPCP mostraron similitud con lo descrito en la literatura, exceptuando el caso de c-myc el cual se encontró en muy bajo porcentaje de expresión (4.7%). Mediante el análisis por PCR de p53 se encontraron 17 variantes (40.4%) y su concordancia con los resultados de inmunohistoquímica fue del 71.4%, indicando que la presencia de las proteínas detectables por inmunohistoquímica no es confirmatoria de su normalidad, ya que en el 62% de los casos, las proteínas están mutadas. Se sugiere que ambos métodos deben ser utilizados conjuntamente para aumentar la sensibilidad en la detección de anomalías en p53, dada su importancia en el diagnóstico, pronóstico, terapia y evolución del tumor. Así también, este estudio contribuyó a formar un banco de ADN de pacientes con CPCP, lo cual permitirá realizar análisis de otros marcadores moleculares de interés clínico.

ASESOR



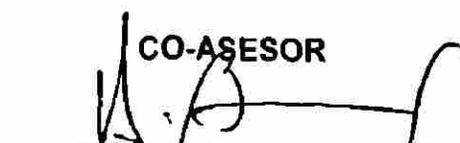
Dr. Augusto Rojas Martínez

ASESOR EXTERNO



Dr. Horacio Decanini Arcaute

CO-ASESOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del Cáncer Pulmonar.

1.1.1 Cáncer pulmonar.

El término cáncer pulmonar designa a los tumores que se originan del epitelio respiratorio (bronquio, bronquiolo y alvéolo), existiendo dos grupos celulares de los que se derivan el 88% de las neoplasias del pulmón: el cáncer de células pequeñas (CPCP) y el de células no pequeñas (CPCNP). Este último se divide en los tipos epidermoide, adenocarcinoma y el cáncer de células grandes¹.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1.2 Morbilidad y Mortalidad.

El cáncer pulmonar representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, particularmente en los países industrializados². En México, al igual que en otras partes del mundo, los tumores malignos son la segunda causa de mortalidad entre la población general, antecedida por las enfermedades cardiovasculares. Dentro de las neoplasias malignas, el cáncer pulmonar ocupó en 1997 el primer sitio como causa específica de muerte a

nivel nacional, con 6,385 defunciones y una tasa de mortalidad de 6.7 por cada 100,000 habitantes³. Cabe mencionar que entre 1992 y 1997 se observó un incremento en la tasa de mortalidad debida a este tipo de cáncer de 6.3 a 6.7 por cada 100,000 habitantes, siendo de esperarse que esta tendencia ascendente continúe en los próximos años³.

En cuanto a la morbilidad, Nuevo León fue uno de los estados que presentó la tasa más alta para este cáncer durante el período de 1993 a 1997, situándose dentro de los tres primeros lugares en los grupos de edad productiva y post-productiva, principalmente en el sexo masculino⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Morbilidad del cáncer pulmonar.

GRUPO	Total de casos en México	# de casos de cáncer pulmonar en Nuevo León	Posición del cáncer pulmonar en Hombres	Posición del cáncer pulmonar en Mujeres
Edad productiva (15-64 años)	221,334	18,799 (8.5%)	2do. lugar	No en los 10 primeros lugares
Edad post-productiva (> 65 años)	124,936	11,581 (9.3%)	3er. Lugar	5to. lugar

Fuente: Registro Histopatológico de Neoplasias en México, DGE/SSA, 1999.

1.1.3 Clasificación histológica e histogénesis del CPCP.

La clasificación histológica para las neoplasias pulmonares de la Organización Mundial de la Salud describe ocho variedades de carcinomas, de las cuales cuatro incluyen la gran mayoría de los tumores (células grandes, adenocarcinoma, escamoso y células pequeñas). Los subtipos histológicos del CPCP son el avelular, intermedio y avelular mixto o combinado de células grandes y pequeñas ⁵ (Tabla 2).

El CPCP representa del 20 al 25% y el CPCNP del 75 a 80% de todos los tumores de pulmón^{1,6,7}. En nuestro país, la frecuencia de los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón se desconoce. También se desconoce la histogénesis del CPCP, pero algunos de estos tumores tienen células con gránulos neurosecretorios idénticos a los encontrados en tumores carcinoides, que sugieren un origen a partir de las células neuroendócrinas o de Kulchistky. Estas células desarrollan tumores que liberan sustancias bioactivas como péptidos, aminas vasoactivas, neuropéptidos, cininas y endorfinas, por mencionar solo algunas^{8,9,10}.

Tabla 2. Clasificación histológica del cáncer pulmonar⁵.

1. Carcinoma de células escamosas
Variante: carcinoma de células escamosa con cambios fusiformes
2. Carcinoma de células pequeñas
 - a. Carcinoma de células aviculares
 - b. Tipo celular Intermedio
 - c. Carcinoma de células aviculares combinado o mixto
3. Adenocarcinoma
 - a. Adenocarcinoma acinar
 - b. Adenocarcinoma papilar
 - c. Carcinoma broncoalveolar
 - d. Carcinoma sólido con formación mucosa
4. Variantes de carcinoma de células grandes
 - a. Carcinoma de células gigantes
 - b. Carcinomas de células claras
5. Carcinoma adenoescamoso
6. Tumor carcinóide
7. Carcinomas de glándulas bronquiales
 - a. Carcinoma quístico adenóideo
 - b. Carcinoma mucoepidermoide
 - c. Otros
8. Otros

1.1.4 Factores de riesgo.

Desde hace tiempo se conoce que uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CP es la historia positiva de tabaquismo y el 85% al

1.1.5 Cuadro Clínico, Pronóstico y Tratamiento.

El cuadro clínico de esta enfermedad se caracteriza por presentar tumores de crecimiento rápido, de localización central o hilar que infiltran rápidamente al parénquima pulmonar y que producen diseminación metastásica en etapas tempranas de la evolución. Este cuadro depende de la localización y extensión del tumor primario y del número, tamaño y localización de las metástasis^{1,6-8} (Figura 2).

Al momento del diagnóstico, un 70 a un 80% de los casos presenta metástasis a distancia, principalmente en hígado, sistema nervioso central y médula ósea. En el 20-30% de los pacientes la enfermedad se encuentra limitada a un hemitórax y ganglios linfáticos regionales (mediastinal, hilar contralateral y supraclavicular ipsilateral)^{1,6-8}. Por las características neuroendócrinas de esta neoplasia, son comunes los síndromes paraneoplásicos, los cuales pueden ocasionar los primeros síntomas de la enfermedad⁸⁻⁹ (Figura 2).

Síntomas iniciales

- Fatiga
- Tos
- Disnea
- Dolor torácico
- Hemoptisis
- Anorexia
- Pérdida de peso
- Difonía
- Disfagia
- Debilidad



**Síndromes Paraneoplásicos:
Hormonal o Endócrino**

- Hipercalcemia
- SIHAD
- Síndrome de Cushing
- Insuficiencia adrenal (cortical)
- Neuromuscular y reumatológico**
- Neuropatía periférica
- Síndrome de Eaton-Lambert
- Polimiositis
- Dermatomiositis

Figura 2. Cuadro Clínico. La aparición de los síntomas del CPCP se debe a la localización y diseminación del tumor primario. Los síndromes paraneoplásicos se presentan en un 10% de los casos del CPCP. SIHAD=Síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética.

Aunque este tipo de tumor es muy sensible a la radio y quimioterapia citotóxica en un rango de un 80 a un 90%, la duración de la respuesta es corta²³. La curación solo se observa en un 15 a 25% de los casos, cuando la enfermedad se encuentra aun limitada al tórax⁸ (Figura 3).

El pronóstico general del CPCP es desfavorable, considerando que los pacientes sin tratamiento tienen una supervivencia de 6 a 17 semanas después del diagnóstico y aquellos que reciben tratamiento combinado, tienen una supervivencia de 40 a 70 semanas. La supervivencia a los 2 años para aquellos que tienen la enfermedad diseminada es menor del 5% y de 15-20% a 5 años en los pacientes con enfermedad limitada^{8, 23}.

Quimioterapia



Radioterapia



MECANISMO DE ACCIÓN:

En ambos métodos, sus efectos citotóxicos son atribuidos a la inducción de apoptosis, la cual es la función principal de p53²⁴⁻²⁷.

Figura 3. Métodos de tratamiento para CPCP. La piedra angular en el tratamiento es la quimioterapia, pero al igual que la radioterapia existe controversia si la presencia de mutaciones en p53 se relaciona con la resistencia al tratamiento²⁴⁻²⁷.

1.1.6 Marcadores de respuesta biológica en el CPCP.

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un agente tóxico²⁸. Los marcadores de respuesta biológica son aquellos que se presentan en estados avanzados del proceso de daño, como son los cambios a nivel genético, de proliferación y diferenciación^{8,29}.

Durante los últimos años ha habido mucho interés por estudiar el CPCP y sus biomarcadores con el fin de facilitar el diagnóstico, evaluar el estadio de la enfermedad, establecer el pronóstico y monitorear la respuesta a los agentes antineoplásicos (Tabla 3).

Tabla 3. Biomarcadores en el CPCP ^{1,10,28-31}

Marcadores Genéticos	<p>Micronúcleos Alteraciones cromosómicas (deleciones o translocaciones en 3p, 5q, 8p, 11p, 13q, 17p) Inestabilidad en microsatélites Oncogenes (familia myc, bcl-2, K-ras, Her-2/neu, telomerasa) Genes supresores de tumor (mutaciones en p53, rb, p16, FHIT)</p>
Marcadores de Diferenciación	<p>Marcadores epiteliales (queratina, involucrina, neurofilamentos) Expresión del gen mucina Antígenos de grupo sanguíneo Secreción neuroendócrina (cromogranina A, sinaptofisina, enolasa neuronal específica, creatinina cinasa isoenzima BB, Leu-7) Secreción de hormonas (ACTH, vasopresina, calcitonina, factor natriurético atrial, bombesina/péptido liberador de gastrina)</p>
Marcadores de Proliferación	<p>Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) Receptores de ácido retinoico (RARβ) Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) Receptores nicotínicos y opioides Receptor tirosina cinasa Receptores peptídicos semejantes a la bombesina Angiogénesis Bcl-2 Ki67</p>

ANTECEDENTES

1.2 Carcinogénesis.

Como ya se ha descrito antes, la malignización de tejido pulmonar comienza cuando un agente carcinógeno o sustancia química presente en el humo del cigarrillo se une covalentemente al ADN e inicia el daño celular¹²⁻¹⁷. Se postula de que el daño al ADN se refleja en rearrreglos cromosómicos, deleciones, amplificaciones o mutaciones puntuales de genes, que pueden activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumor. Para que esto último ocurra se requiere de múltiples eventos genéticos (10 a 20), para que se inicie un desajuste en el crecimiento celular que conlleve posteriormente a la malignidad^{1,6}. Estos eventos pueden durar varias décadas, lo que se conoce como período de latencia, el cual abarca desde el tiempo de exposición inicial hasta el desarrollo clínico de la neoplasia³².

1.3 Predisposición genética y marcadores moleculares.

A pesar de que el patrón de herencia mendeliana no es claro, existen varias implicaciones de una asociación familiar, como son las mutaciones hereditarias en Rb (pacientes adultos con retinoblastoma) y en p53 (síndrome Li-Fraumeni), en donde existe de 2 a 3 veces mayor riesgo a desarrollar CP u

otros cánceres, sin ser fumadores^{1,33}. Además, varios estudios epidemiológicos han propuesto una asociación entre la enzima P450 o genotipos de fragilidad cromosómica (sensibilidad al mutágeno) y el CP¹.

Es bien sabido que con la acumulación de cambios genéticos, el epitelio pulmonar presenta de manera secuencial cambios fenotípicos durante la transformación maligna (epitelio normal → metaplasia → displasia → carcinoma *in situ* → carcinoma invasor), pero el orden y el tipo de cambios moleculares no es claro⁶.

1.3.1 Alteraciones cromosómicas.

Se han observado pérdida de heterocigocidad (LOH en inglés) en las regiones cromosómicas 3p, 5p, 11p, 13q y 17p^{31,33}.

La región 3p14-23 está asociada particularmente a CPCP^{6,29}. En este segmento residen varios genes que podrían estar involucrados en este tipo de tumor, como el gen tumor-supresor FHIT, que se encuentra en la región 3p14.2 y cuya expresión está ausente en el 91-100% de todos los casos³⁴⁻⁴⁰. Adicionalmente se ha encontrado que la extensión y frecuencia del daño en esta región cromosómica se correlaciona con la progresión tumoral y severidad del cuadro clínico³⁷.

1.3.2 Oncogenes asociados a CPCP.

Los principales mecanismos para la activación de los oncogenes son la translocación cromosómica, las mutaciones puntuales y la amplificación génica o sobre-expresión^{18,29,31,41}. La activación de los oncogenes generalmente tiene un efecto dominante⁴¹.

Los oncogenes que parecen tener valor pronóstico en el CPCP son los de familias myc, Her-2/neu, bcl-2 y las telomerasas^{1,6,29,31} (Tabla 4). La familia ras presenta mutaciones en menos del 1% de los casos, por esta razón se sugiere que puede existir un mecanismo patogenético diferente al CPCNP donde se encuentra mutado en el 30% de los casos^{1,31,42}.

Tabla 4. Principales oncogenes en el CPCP y su frecuencia^{1,29-47}.

Gen	Función	Frecuencia
Familia myc	Fosfoproteína nuclear. Regulación de la transcripción. c-myc se acopla al ciclo celular.	Amplificado en un 11-24% y sobre-expresado en el 83% de los tumores.
Her-2/neu	Glicoproteína transmembranal Receptor con dominio de tirosina cinasa (regulador en la transducción de señal).	Amplificación rara y < del 10% es sobre-expresado.
Telomerasa	Enzima que mantiene la longitud de los telómeros y su inhibición induce el envejecimiento celular ⁴⁷ .	Sobre-expresión en > 90%.
bcl-2	Proteína reguladora del ciclo celular Función antiapoptótica ^{31,48} .	Sobre-expresión en >75%.

1.3.3 Genes supresores de tumor asociados a CPCP.

Los genes supresores de tumor proporcionan señales que inhiben la proliferación celular, principalmente cuando ocurre daño al ADN. Si el daño es muy extenso, estos genes inducen apoptosis³¹. Cuando ocurre una inactivación en ambos alelos del gen (mecanismo recesivo), se promueve la transformación maligna^{31,41}. Los genes supresores de tumor FHIT³⁴⁻⁴⁰, Rb^{1,8,50} y p53^{1,51-54} están casi universalmente inactivados en CPCP.

El gen supresor p53 es uno de los puntos clave en la investigación actual en el cáncer, de ahí que muchos estudios se han enfocado a éste y su implicación en el CPCP⁵¹⁻⁵⁸. p53 es conocido como el maestro guardián del genoma y se declaró molécula del año en 1993 por la revista Science⁵⁹. Su estructura molecular fue conocida en 1985 cuando McBride⁶⁰ y Benchimol⁶¹ asignaron el locus del gen al brazo corto del cromosoma 17 en la banda 13. El gen tiene 11 exones y se han identificado dos promotores de transcripción, uno localizado 100 a 200 pb antes del primer exón (no codificante) y el segundo es un promotor muy fuerte localizado en el primer intrón⁶². La proteína que codifica es llamada con el mismo nombre y contiene 393 aminoácidos. Su forma tridimensional es parecida a un "sandwich"⁶³. Presenta tres dominios principales, siendo el segundo el de unión a la secuencia específica del ADN donde suceden cerca del 40% de las mutaciones de sentido erróneo (principalmente en los aminoácidos 175, 248 y 273)^{20,63,64} (Figura 4).

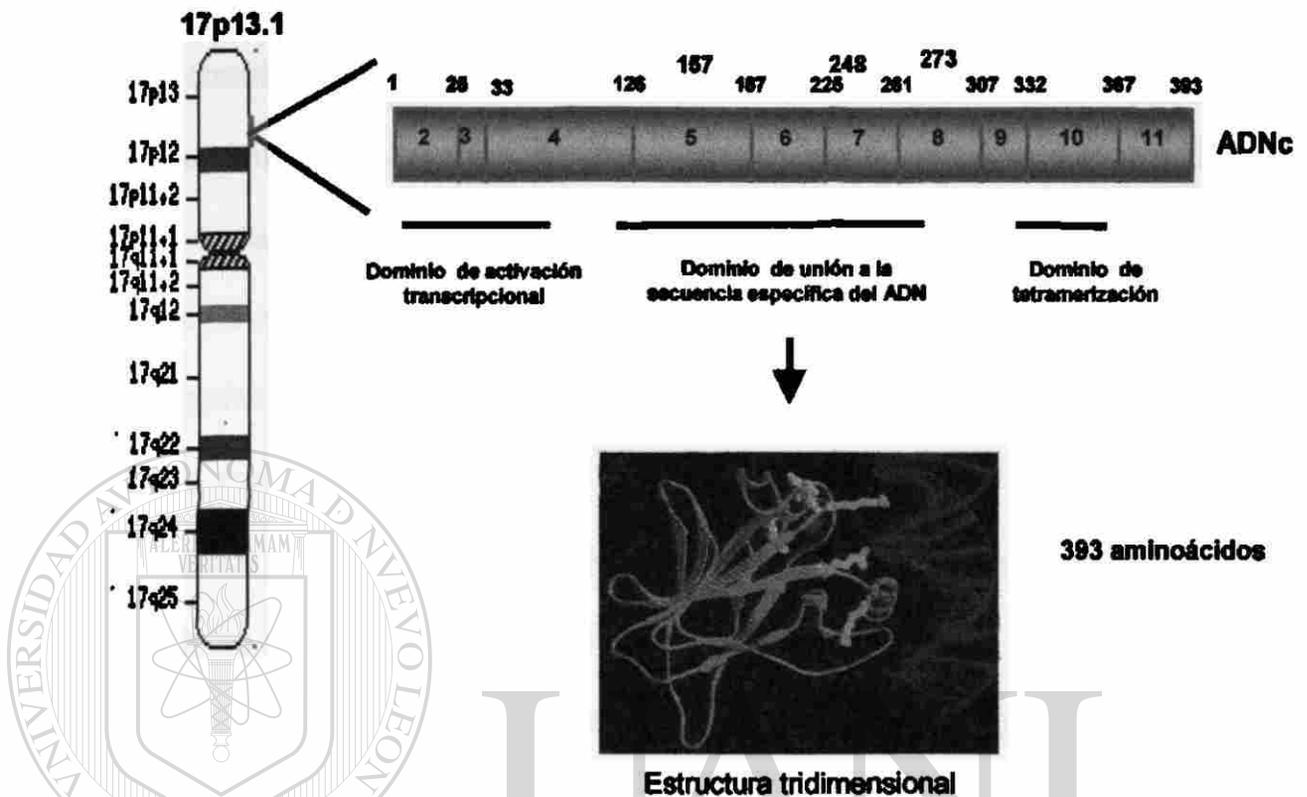


Figura 4. Características de p53. Gen localizado en el cromosoma 17p13.1. Tiene 11 exones (de los cuales el primero no es codificante). La cadena polipeptídica se divide en cuatro regiones, la primera corresponde a los aminoácidos 1-42 que forman el dominio de activación transcripcional que media interacciones proteína-proteína. La segunda corresponde a los aminoácidos 102-292 y es la región central que se une a la secuencia específica del ADN. La tercera corresponde a los aminoácidos 234-355 y es la que permite su oligomerización al ADN. La cuarta es la porción carboxiterminal que comprende los aminoácidos 367-393 y es un sitio no específico de unión a ácidos nucleicos, con una función muy importante en la regulación alostérica⁶⁵.

La expresión normal del gen p53 regula el crecimiento celular y evita la transformación neoplásica. Esta expresión se activa en respuesta a estímulos genotóxicos (incluido el daño al ADN, deficiencia de oxígeno, radiación, estrés oxidativo y depósitos alterados de ribonucleótidos). Su función se lleva a cabo por diversos mecanismos, tales como interrumpir el ciclo celular en fase G1,

iniciar la reparación del ADN, propiciar la diferenciación celular e inducir la muerte celular programada, previniendo así que se perpetúe el daño celular⁶⁵⁻⁶⁸.

En cuanto a la inactivación de p53, Volgestein y Kinzler⁶⁹ propusieron cinco mecanismos: a) deleción de uno o ambos alelos del gen que provoca reducción en la expresión de genes inhibidores del crecimiento, b) mutaciones que alteran la estructura tridimensional de las proteínas y que no permiten su oligomerización (como ocurre con frecuencia en el CP y cáncer de esófago), c) mutaciones con sentido erróneo que destruyen la funcionalidad de la proteína, d) degradación lítica de la proteína, y e) amplificación del oncogen MDM2 que tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de p53.

La incidencia de mutaciones de p53 en CPCP varía según los reportes desde un 45-57%^{51,58} a un 60-70%^{52,70,71}, o bien mayor del 80%^{53,54}. La mayoría de las mutaciones reportadas se encuentran dentro de los exones 5-8 y se les ha asociado con una vida media mayor de la proteína nuclear, lo que las hace permanecer más tiempo y favorece su detección por inmunohistoquímica⁷²⁻⁷⁴, aunque es importante destacar que para la detección de alguna alteración cuantitativa o cualitativa de p53, deben realizarse estudios conjuntos por métodos moleculares y de inmunohistoquímica (Tabla 5).

Tabla 5. Sitio de mutaciones reportadas para el gen p53 en CPCP^{51,52-54,58-59}.

Exón	Codón mutado *
5	126,135,141,142,144,147,151,154,155,157,158,159,167,171,175,176,179
6	190,193,194,195,196,199,205,209,212,213,214,217,218,220
7	234,236,242,245,248,249,256,258
8	265,266,273,275,278,281,282,291
9	313,334

* Las mutaciones en su mayoría son transversiones G-T. Los sitios más frecuentes se encuentran en azul.

1.3.4 Marcadores de proliferación y diferenciación celular en el CPCP.

El CPCP pertenece al espectro de las neoplasias pulmonares neuroendócrinas, al igual que el tumor carcinoide típico y el atípico, mostrando características histológicas y biológicas que las diferencian a cada una de ellas; aunque cabe mencionar que en ocasiones es difícil el diagnóstico, ya que presentan aspectos histológicos y clínicos inusuales^{8,10,76,77}.

Es bien conocido que las características de diferenciación neuroendócrina van disminuyendo desde el carcinoide típico al CPCP, y que ésto es paralelo al incremento en la actividad proliferativa (evaluada con anticuerpos monoclonales contra Ki67 y antígeno nuclear de proliferación celular) (tabla 3). Esta disminución en los factores de diferenciación y el aumento en el índice de proliferación observado en el CPCP, es probablemente el resultado de la pérdida de la función de genes supresores de tumor (principalmente p53 y Rb)^{8,10}.

Además, mediante estudios con líneas celulares de CPCP se ha evidenciado que neuropéptidos (como bombesina, vasopresina, galanina, bradiquinina, péptido vasointestinal activo, endotelina y neurotensina) pueden actuar como factores de crecimiento autócrino (en células tumorales) o parácrino (en células normales) y al ser retirados se observa disminución de la proliferación de la línea celular. Así, que es claro que la proliferación celular se estimula mediante una señal independiente o bien de múltiples vías de señales de transducción que actúan en sinergismo o de manera combinada^{78,79}.

Uno de los marcadores neuroendocrinos de importancia pronóstica es la enolasa neuronal específica que se relaciona con la extensión de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y la sobrevida⁶⁰.

1.3.5 Implicaciones clínicas y terapéuticas de los biomarcadores.

Existe evidencia de que los marcadores moleculares (oncogenes y genes supresores de tumor) están involucrados en la determinación de la sensibilidad a drogas y radioterapia^{24,81,82}. A pesar de esto, existe controversia sobre su correlación con una sobrevida corta y por tanto su papel pronóstico no es claro⁸³.

El gen p53 tiene implicaciones clínicas importantes, entre las que se puede destacar: su uso potencial en el diagnóstico temprano como marcador molecular en el hallazgo de mutaciones⁵⁵, su utilidad en el estudio celular diagnóstico a través de biopsia y aspirado con aguja fina (diferenciando lesiones benignas, premalignas y francamente malignas)^{75,84}, su uso como indicador de metástasis⁵², su utilidad en el seguimiento de pacientes con cáncer después de la quimioterapia y radioterapia⁷⁹, y en la elección de la terapia más adecuada (ya que tumores con p53 mutante presentan resistencia al tratamiento con cisplatino, etopósido y adriamicina)^{24,84,85}.

Los marcadores de proliferación y de diferenciación también han tomado fuerza en los últimos años, debido a la evidencia que algunos neuropéptidos pueden actuar como factores de crecimiento autócrino y parácrino en líneas

celulares de CPCP, lo cual ha conducido a estudios con antagonistas de neuropéptidos de amplio espectro análogos a la sustancia P, lo que puede ser en un futuro alternativa en el manejo de esta neoplasia⁶³.

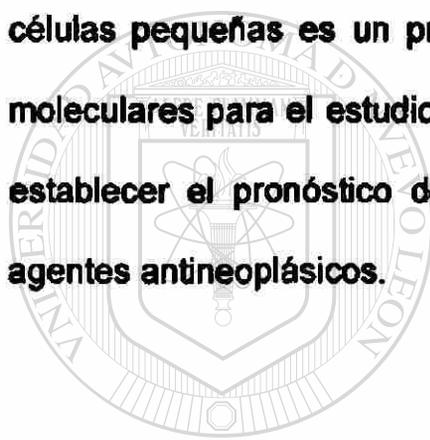
1.3.6 p53 y terapia génica.

El mayor alcance que se ha logrado con el conocimiento de la biología molecular del cáncer y que cambia la perspectiva en la terapéutica médica en general es el uso de la terapia génica. El uso de p53 en la terapia génica no sólo está restringido a tumores que presentan ausencia o mutación de dicho gen, sino que también es útil en tumores en los que éste se encuentra intacto; por ejemplo, aumentando la fosforilación del extremo carboxiterminal de p53 se aumenta su capacidad de activar a p21 para finalmente propiciar la detención del ciclo celular G1^{86,87}. La aplicación ideal es la introducción del gen que se encuentra alterado en la célula cancerosa, en este caso p53, a través de un vector retroviral o adenoviral, al que se le ha sustraído su maquinaria replicativa y que tiene como función insertar el gen p53 normal dentro del genoma celular^{25,87,88}. Hay varios estudios donde se han utilizado vectores adenovirales o liposomas catiónicos con p53 de tipo silvestre en líneas celulares cancerígenas y en modelos murinos donde se encontraba ausente, observándose la supresión de la actividad tumoral^{87,90-92} y aumento en la sensibilidad a la radioterapia tanto *in vitro* como *in vivo*⁸⁹.

CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

La detección de algunas de las alteraciones genéticas que en la literatura internacional han sido involucradas en el desarrollo de cáncer pulmonar de células pequeñas es un requisito para la implementación de los métodos moleculares para el estudio de biomarcadores de este cáncer, lo que permitirá establecer el pronóstico de las lesiones y guiará la respuesta del tumor a agentes antineoplásicos.



UANL

2.2 OBJETIVOS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

2.2.1 Objetivo general.

Analizar la frecuencia de mutaciones y alteraciones en la expresión de marcadores moleculares asociados en el cáncer pulmonar de células pequeñas, a partir de material tumoral embebido en bloques de parafina.

2.2.2 Objetivos específicos.

- **Analizar histopatológicamente las muestras de tejido pulmonar.**
- **Analizar la expresión de enolasa neuronal específica, cromogranina, citoqueratinas y ACTH por inmunohistoquímica.**
- **Analizar la expresión de p53 y c-myc por inmunohistoquímica.**
- **Estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de tejido pulmonar embebido en parafina y establecer un banco de ADN de dichas muestras.**
- **Analizar la frecuencia de mutaciones de los exones 5-8 del gen p53 mediante la técnica de PCR-heterodúplex.**
- **Determinar las mutaciones presentes en los diferentes exones del gen p53 por secuenciación nucleotídica.**
- **Relacionar los hallazgos clínicos con las alteraciones detectadas.**
- **Correlacionar los resultados de las variantes detectadas por los métodos de inmunohistoquímica y PCR-heterodúplex.**

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados se siguió la siguiente estrategia:

- 1.- Diseño de un formulario dirigido al padecimiento en estudio (anexo 1).
- 2.- Selección de los casos, utilizando criterios de inclusión y exclusión.
- 3.- Recolección de las muestras de material pulmonar embebido en parafina.
- 4.- Obtención de nueve cortes de cada muestra embebida en parafina de 6 μ m de grosor.
- 5.- Distribución de los cortes para el estudio histopatológico, para el análisis inmunohistoquímico (de ACTH, enolasa, cromogranina, citoqueratinas, c-myc y p53), y para la extracción de ADN y el análisis de mutaciones de los exones 5-8 de p53 por PCR- herodúplex (Figura 5).
8. Análisis de los hallazgos obtenidos de histopatológica, inmunohistoquímica y molecular en base a sus características clínicas.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo, origen de los reactivos y equipo.

4.1.1 Área de trabajo.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L y en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Regional de Especialidades No. 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (HRE-IMSS).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1.2 Material Biológico.

Se colectaron especímenes de pulmón (material de biopsia y necropsias) conservados en bloques de parafina por el Departamento de Anatomía Patológica del HRE-IMSS No. 34.

4.1.3 Reactivos Químicos.

Para el análisis histopatológico se utilizó etanol, xileno, hematoxilina, eosina y ácido clorhídrico de Merck, SA de CV México, D.F.

Para la inmunohistoquímica se utilizó 3-aminopropyltriethoxy silano 98% de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA). Los anticuerpos monoclonales (anti-ACTH, anti-enolasa neuronal específica, anti-cromogranina, anti-citoqueratina de alto y bajo peso molecular, anti-myc, anti-p53), proteína bloqueadora, proteinasa K y el reactivo bloqueador de la peroxidasa fueron adquiridos de Dako Corporation (Carpintería, CA, EUA).

Para el aislamiento de DNA se utilizó xilol, etanol, ácido clorhídrico y acetona de la compañía Merck y EDTA, NaCl, trizma base, nonident P-40, proteinasa K, monolaurato de polioxoetilensorbitano (Tween 20) de Sigma Chemical Company.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó Taq DNA polimerasa, amortiguador de reacción, cloruro de magnesio y dNTPs de Promega (Madison, WI, EUA). Los oligonucleótidos fueron comprados a Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA) y el aceite mineral a Sigma Chemical Company.

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó agarosa, EDTA, trizma base, ácido bórico, azul de xilencianol, azul de bromofenol y bromuro de etidio de Sigma Chemical Company. Para la electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, trizma base, EDTA, TEMED y glicerol, también de Sigma Chemical Company. Como marcadores de peso

molecular se utilizaron los plásmidos *pBS* o *pUC* digeridos con la enzima de restricción *Hae* III. La enzima de restricción fue adquirida de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA) y los DNAs plasmídicos se obtuvieron de la plasmidoteca de la ULIEG (Monterrey, NL).

La purificación del producto de PCR se realizó con el estuche Pre-Sequencing de USB Corporation (Cleveland, OH, EUA). Los nucleóticos radiactivos utilizados en la secuenciación se adquirieron de la compañía Amersham International (Buckinghamshire, Reino Unido).

4.1.4 Material.

Las micropipetas de precisión de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). Las puntillas para las micropipetas, los tubos eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml, los tubos cónicos de 15 y 50 ml y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, TX, EUA). Los portaobjetos corning de 25 x 75 mm y cubreobjetos 24 x 50 mm fueron de Sigma Chemical Company.

4.1.5 Equipo.

Se utilizó una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C, 115V/60Hz y Termomixer modelo 5436 de Brinkmann (Hamburgo, Alemania), vórtex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania).

El termociclador utilizado fue el PCR express de Hybaid de Reino Unido).

Para analizar los productos amplificados, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal modelo H5 de Gibco BRL, cámaras verticales de 20 x 40 cms y una fuente poder Modelo 500 de Gibco BRL.

Para analizar los geles, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa molecular Analyst de BIO RAD (Hercules, CA, EUA).

En el análisis histológico se utilizó el crióstato Microm HM505N, baño de flotación de tejido Lab-line, microscopio Zeiss y el aparato para inmunohistoquímica Dako *Autostaines Universal Stainig System* de Dako Corporation.

4.1.6 Equipo computacional.

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 97* (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos *Microsoft Power Point 97* (Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (Adobe System Incorporated) y UMAX Scan (UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc). Se utilizó un equipo de documentación de datos para el análisis de los geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO-RAD) y un Equipo para Secuenciación Genomix LRTM (Genomix Co, Foster City, CA, EUA).

Los programas computacionales de Biología molecular empleados fueron: *Molecular Analyst* (BIO-RAD), *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels 1992,

University of Wisconsin Genetics, Madison, WI. E.U.A.), *Oligo* versión 4.0 (Plymouth, MN, E.U.A.) y Los programas por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); BLAST Network Service (Blaster); Gen Bank. El programa utilizado para comunicación en la red fue el *Microsoft Internet Explorer* versión 4.0.

4.2 Métodos.

Este estudio constó de dos etapas: una de carácter clínico que incluyó el diseño de un formulario dirigido al padecimiento en estudio (anexo1). Este formulario fue contestado mediante la revisión de registros que existen en el Departamento de Anatomía Patológica del HRE No. 34 (IMSS) y de los expedientes clínicos del mismo hospital. La segunda etapa la constituyó el trabajo experimental, en el cual se utilizaron las técnicas propuestas en los objetivos específicos.

4.2.1 Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.

Criterios de Inclusión.

Para los fines de este estudio se eligió un lote de muestras del Departamento de Anatomía Patológica del HRE No. 34 (IMSS) con diagnóstico histopatológico de cáncer pulmonar de células pequeñas y sus subtipos histopatológicos.

posteriormente seguir con 4 a 5 inmersiones en hidróxido de amonio al 0.5%, con la finalidad de neutralizar el pH. Enseguida se hicieron 10 inmersiones en agua corriente. Después de esto, los cortes se colocaron en el colorante eosina durante 30 a 45 seg. Los siguientes pasos fueron lavados sucesivos con etanol al 80%, 96% y 100% (10 inmersiones en cada uno) y finalmente se sumergieron dos veces en xileno durante 5 min cada vez. Para preservar las muestras permanentemente, se colocó una resina (bálsamo de Canadá) y se analizaron por microscopía de luz.

4.2.3 Análisis inmunohistoquímico.

De cada bloque de parafina se obtuvieron 6 cortes con un grosor de 6 μm cada uno, con la finalidad de analizar por separado cada marcador propuesto.

4.2.3.1 Preparación de portaobjetos.

Se prepararon los portaobjetos donde serían montados los cortes. Esto consistió en sumergir los portaobjetos en silano al 2% (3-aminopropyltriethoxy silano 98%) durante 2 min, para posteriormente enjuagar en agua destilada 10 veces. Después se secaron en una estufa a 37 °C por 2 hr y finalmente se agregó una gota de pegamento (Elmer's glue) a una dilución 1:10 para colocar el tejido. Se esperó a que secaran y se continuó con la técnica de inmunohistoquímica.

4.2.3.2 Procedimiento de inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica consistió en sumergir los portaobjetos en xileno durante 5 min en dos ocasiones, seguido de un paso en etanol al 100%, al 96% y al 80%, durante 3 min en cada alcohol. Los tejidos se hidrataron en agua destilada durante 3 min y posteriormente se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con 200 μ l de H₂O₂ al 3% por un periodo de 5 min. Después se enjuagaron en agua corriente por 3 min. Hasta este punto, se siguió el mismo protocolo en todos los casos, pero cabe mencionar que en lo que respecta a los anticuerpos empleados para enolasa, cromogranina, ACTH y p53 se requirió un pretratamiento con antígeno de recuperación a 90°C y a 37°C durante 20 min, respectivamente; o en el caso de citoqueratinas, el pretratamiento se realizó con proteinasa K (10 mg/ml) a 37°C por 5 min. Sólo el anticuerpo para c-myc no requirió pretratamiento. Los cortes con pretratamiento se enjuagaron con agua corriente durante 3 min.

En todos los casos se adicionaron 200 μ l de proteína bloqueadora y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min e inmediatamente después se agregaron 200 μ l del anticuerpo primario (dilución 1:500 - 1:1000) y se incubaron durante 5 a 30 min a 37 °C (la incubación de 5 min se hizo para los anticuerpos específicos anti-p53, c-myc, cromogranina y citoqueratinas y la de 30 min para anti-ACTH y enolasa). Posteriormente se enjuagaron en agua corriente por 3 min, para luego agregar 200 μ l del anticuerpo secundario (LSAB2 Link HRP K675), el cual se incubó a 37 °C por 10 min. Se continuó con

un lavado en agua corriente por 3 min, para luego adicionar 200 μ l de peroxidasa estreptavidina (LSAB2 streptavidin HRP K675) y se incubó a 37°C por 10 min. Se lavaron los cortes con agua corriente por 3 min y se adicionaron 200 μ l del sustrato (DAB), las laminillas se incubaron por 5 min a temperatura ambiente para que se desarrollara el color. Se enjuagaron con agua corriente por 3 min, para luego contrastar con hematoxilina por 20 seg, seguido de un enjuague con agua corriente por 3 min. Finalmente, se colocó una gota de bálsamo de Canadá y se deslizó un cubreobjetos, se esperó a que secan las preparaciones y se observaron al microscopio de luz a 10, 40 y 60X para analizar la presencia de los marcadores empleados.

4.2.4 Análisis Molecular.

Dos cortes de 6 μ m de grosor (realizados con el microtómo) de cada bloque de parafina fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml, para llevarse a cabo la extracción de ADN. Posteriormente se llevó a cabo la PCR para los exones 5-8 de p53 y se analizó la presencia de alguna mutación mediante la visualización del corrimiento electroforético anormal por la técnica de análisis de Heterodúplex. Finalmente, se realizó la purificación del producto anormal para su secuenciación. A continuación se describe detalladamente cada técnica empleada.

4.2.4.1 Extracción de ADN genómico a partir de muestras embebidas en parafina.

Para la realización de esta técnica, nos basamos en los procedimientos descritos por Wright DK-Manos MM (1990)⁸⁴ y por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los E.U. (1997)⁸⁵, realizando ligeras modificaciones. Durante todo el procedimiento se usaron guantes y se tuvo la precaución de limpiar la cuchilla del microtomo con xileno y etanol al 100% entre cada muestra, para evitar cualquier contaminación.

Para iniciar la extracción de ADN, se colocaron en un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 ml, dos cortes de 6 μm de grosor o bien cortes de 5-10 μm . Se agregó 1 ml de xileno a cada tubo, se cerraron los tubos y se mezclaron a temperatura ambiente durante 30 min o a 55°C por 15 min, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 a 5 min, se removió cuidadosamente el xileno con una pipeta y se repitió el paso anterior. Después se agregaron 500 μl de etanol absoluto a cada tubo y se mezclaron por inversión. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 a 5 min, se retiró cuidadosamente el etanol con una pipeta y se repitió nuevamente el paso anterior. La pastilla obtenida se secó al vacío hasta que el etanol se evaporó completamente. Alternativamente, se agregó 1 gota (50 μl) de acetona a cada tubo. Se dejaron abiertos los tubos y se colocaron en un bloque caliente (thermomixer) a una temperatura de 50°C para facilitar la evaporación de la acetona.

Después de la centrifugación, la pastilla se resuspendió en 100 – 200 μ l de buffer de lisis (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0.5 %, Nonident P-40 al 0.5%) y 3-6 μ l de proteinasa K (10 mg/ml)). La concentración final de proteinasa K fue 0.3-0.5 mg/ml. Se incubaron en thermomixer con agitación vigorosa a 55 °C durante dos días completos para disminuir actividad de DNAsas, adicionando la misma cantidad de proteinasa K a los tubos cada día que se mantuvieron en incubación.

Después de la incubación con el buffer de lisis, se centrifugaron los tubos brevemente para remover cualquier líquido de las paredes y se siguió con la inactivación de la proteinasa K a 95 °C durante 8 a 10 min y después se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 a 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó la pastilla que contenía los restos celulares a -20 °C. Previo a su almacenamiento se procedió a determinar la calidad del ADN mediante un gel de agarosa al 0.8% y se extrajeron alícuotas de 2.5 y 5 μ l para la PCR. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.

La estimación de la calidad y la concentración del ADN se realizó en geles de agarosa al 0.8%, utilizando como buffer de corrida TBE 1X. Se realizaron diluciones 1:5 de cada muestra de ADN extraído. De cada dilución se tomaron 4 μ l y se mezclaron con 1 μ l de jugo azul 6X. De la misma manera se colocó un ADN estandar de concentración y calidad conocida. Las muestras

En la tabla 6 se describen los iniciadores que se emplearon y sus características más importantes.

Tabla 6. Iniciadores para cada exón y sus características.

Exón	Iniciadores	Región que amplifican	fragmento (pb)	TM
5	Ex5P53-1 5' ttact tggccctgact ttc 3' Ex5P53-2 5'ctc tccagccccagc tgctc 3'	48 pb río arriba y 23 pb río abajo del exón 5	250	60°C
6	Ex6P53-1 5' attcctcac tgattctctt 3' Ex6P53-2 5' cccctctcccagagacccc 3'	21 pb río arriba y 35 pb río abajo del exón 6	169	55°C
7	Ex7P53-1 5' acaggtctccccaaggcgcg 3' Ex7P53-2 5' tgcagggtggcaagtggct 3'	52pb río arriba y 24 pb río abajo del exón 7	184	85°C
8	Ex8P53-1 5' ggtaggacctgatttcttactgcc 3' Ex8P53-2 5' cccttggtctctccacgcctcttg 3'	55pb río arriba y 40 pb río abajo del exón 8	227	61°C

Fuente: Buchman L, Chumakov PM y cols. *Gene*.1988;70:245-252⁹⁷

Las condiciones para llevarse a cabo la reacción de PCR se describen en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Condiciones de reacción de la PCR para los exones 5-8.

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final
Buffer ADN pol Taq 10X	3	1X
Primer sentido 5 μ M	2	0.3 μ M
Primer antisentido 5 μ M	2	0.3 μ M
MgCl ₂ 25mM	2.4	2mM
dNTPs 10mM	0.9	0.3mM
Taq 5U/ μ l	0.5	0.08U/ μ l
ADN	variable	variable
Agua miliQ	Aforar a 30	---
Aceite mineral	1 gota	---

Tabla 8. Condiciones del programa del termociclador.

Paso	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	5 min
2	Desnaturalización	95	1 min
3	Alineamiento	Variable según exón	1 min
4	Extensión de oligos	72	2 min
5	40 veces del paso 2 al 4		
6	Extensión final	72	5 min
7	Fin	---	---

4.2.4.4 Análisis de los productos amplificados.

Para verificar el éxito de la PCR, 4 μ l del producto amplificado + 1 μ l de jugo azul al 6X (Azul de bromofenol 0.25% y xilencianol 0.25%, en glicerol al 30%) se analizaron en geles de agarosa al 2% con buffer de corrida TBE1X (tris-borato 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 1 mM). Se utilizó como marcador de peso molecular *pUC19* o *pBSK* digeridos con *Hae III*. La electroforesis se realizó inicialmente a 55 V en una cámara horizontal para que entrara la muestra y luego se continuó a 85 V por un tiempo aproximado de 45 min. Después de la corrida, el gel se tiñó en bromuro de etidio (2 μ g/ml) por un tiempo de 5 min seguido de un enjuague con agua corriente por otros 5 min. Transcurrido este tiempo, se observó el gel en el Gel Doc 1000. Las bandas de los productos amplificados de los exones 5-8 migraron entre el azul de xilencianol y el azul de bromofenol.

4.2.4.5 Análisis de mutaciones mediante heterodúplex.

Este método es efectivo para detectar alguna variante ó mutación en el producto de PCR que se pretende estudiar. Su análisis se basa en la diferencia conformacional entre el ADN heterodúplex de doble cadena y un ADN homodúplex estándar o normal en solución acuosa^{98,99}.

La formación del heterodúplex en la doble cadena es debido a los cambios en la secuencia del ADN (inclusive en una sólo base), generando una estructura conformacional anormal al momento de alinearse con la hebra complementaria del otro alelo y al ser comparada con el corrimiento de aquellas cadenas normales (hebras reapareadas de un mismo alelo) u homodúplexes se observa la diferencia^{98,99}, como se muestra en la figura 6.

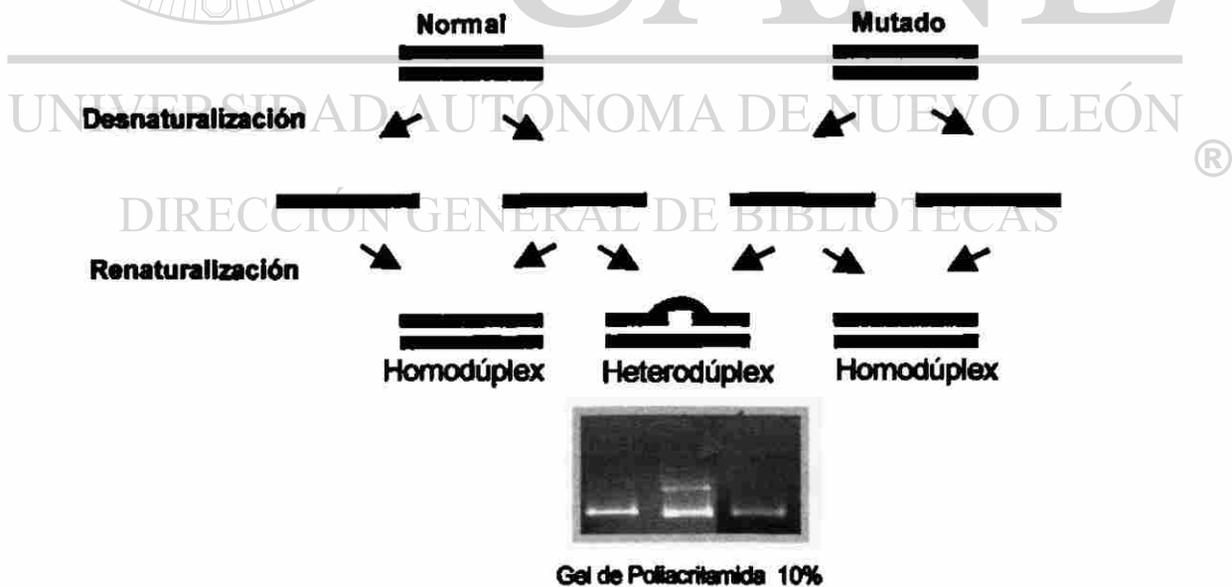


Figura 6. Técnica de análisis por heterodúplex.

El producto amplificado se desnaturaliza a 95°C, las cadenas se separan y al dejar a temperatura ambiente se renaturalizan, realineándose las cadenas. Al presentar mutación en alguna de las cadenas y al alinearse con una normal se forma un heterodúplex que al compararse con el corrimiento de la realineación de las dos cadenas completamente normales permite observar la diferencia.

El análisis de las mutaciones, se llevó a cabo amplificando cada exón mediante PCR, tanto de los pacientes como de los controles. Posteriormente los productos amplificados se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 min, para separar el ADN en cadenas sencillas, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 45 min a 1 hr, con la finalidad de que se llevara a cabo la renaturalización del ADN.

Para realizar la electroforesis del heterodúplex se utilizó una cámara vertical con vidrios de 20 x 40 cm, peine de 15 carriles y separadores de 2 mm de espesor. Los vidrios se lavaron con jabón, etanol y agua destilada; una vez secos, se les colocó una capa de silicón (sigmacote). Posteriormente se acomodaron los vidrios y los separadores para luego sellarse con cinta plástica.

Se preparó la mezcla para el gel de poliacrilamida al 10% en un volumen de 60 ml, se vertió cuidadosamente en los vidrios, se colocó el peine y se dejó polimerizar aproximadamente 1hr. Luego se colocó en la cámara de electroforesis con buffer TBE 0.6X. Se retiró el peine y se lavaron los pozos con el mismo buffer de la cámara.

Después de la incubación de las muestras, 20 µl del producto amplificado se mezclaron con 10 µl de solución stop (formamida 95%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0.05% y xilencianol 0.05%) y se cargaron en el gel de poliacrilamida. El producto amplificado restante se almacenó a -20°C, para posibles reamplificaciones posteriores.

El gel se corrió a 11 mA, 30 W y 1500 V. El tiempo de corrida fue de 12 a 18 hrs según el tamaño de producto a analizar. Al finalizar la migración, se despegaron los vidrios, teniendo cuidado de no romper el gel. Para la manipulación del gel, se cortó aproximadamente en el sitio donde se consideró que estaban las bandas, tomando como referencia que el segundo azul corresponde a la migración de un fragmento de 300 pb. Se procedió a tefirlo en bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 10 min y se continuó con el lavado en agua corriente por 10 min, para quitar el exceso de bromuro. Finalmente se analizó el patrón de corrimiento en el Gel Doc.

4.2.4.6 Purificación del producto amplificado.

Cualquier alteración en la migración de las bandas en el grupo de los pacientes se consideró como sospecha de presentar una mutación, por lo que se procedió a la amplificación de dicha muestra y verificación de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2%. Una vez confirmada la amplificación, se procedió a la purificación con el estuche de enzimas pre-sequencing de USB Corporation, como se puede observar en la figura 7. Cabe mencionar que sólo 10 μl del producto amplificado (del un total de 30 μl) se utilizaron para purificar y el resto se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A los 10 μl del producto de PCR se les adicionaron 2 μl de la enzima exonucleasa I (10 U/ μl) y 2 μl de fosfatasa alcalina (2 U/ μl), ambas útiles para eliminar los iniciadores de cadena sencilla, el ADN de cadena sencilla extraño y el exceso de dNTPs que interfieren con la

reacción de secuenciación. Se incubaron a 37°C por un periodo de 15 min, seguido de su inactivación a 80°C por 15 min en el termociclador. A las muestras tratadas con este estuche enzimático se les sometió directamente a secuenciación.

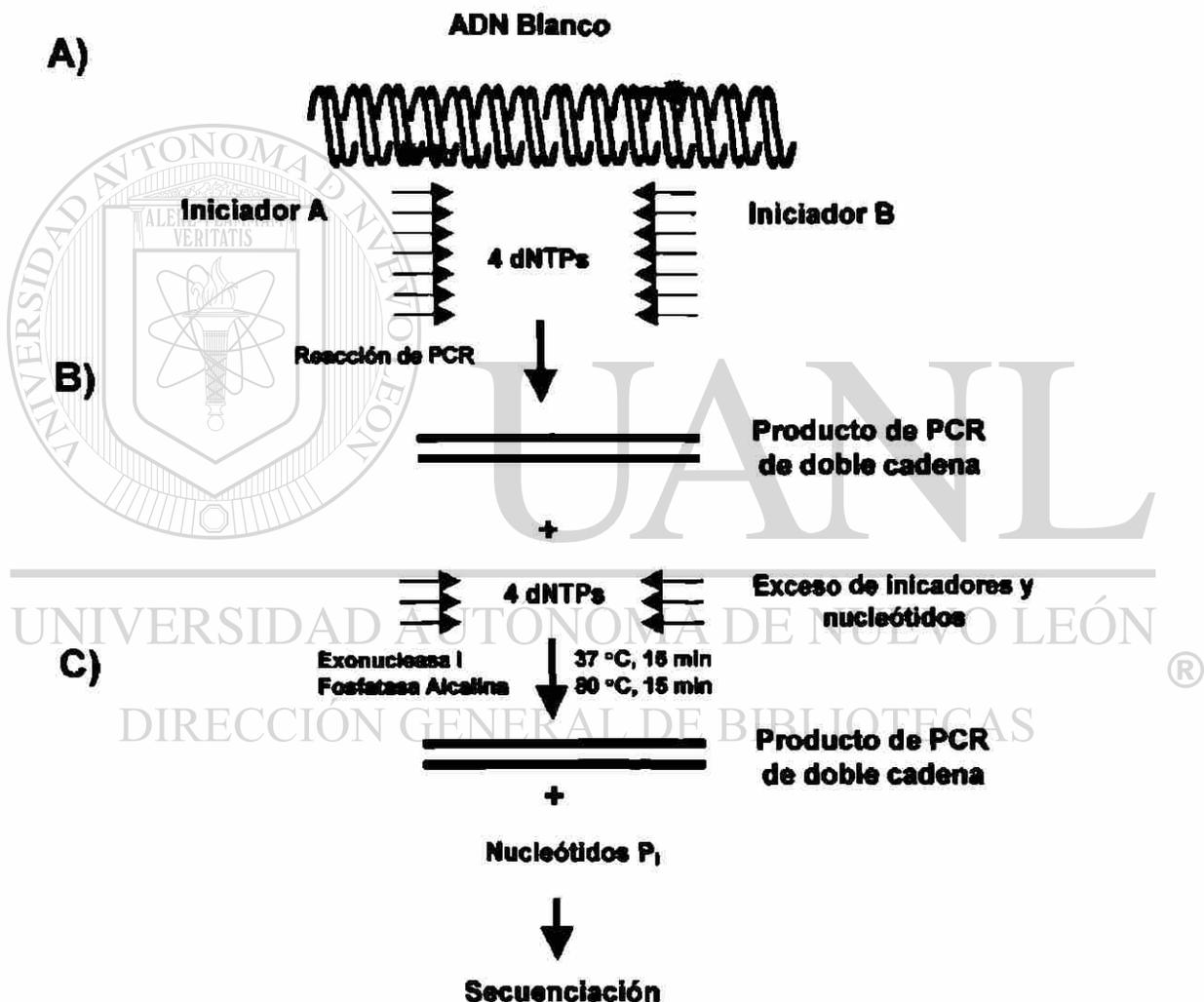


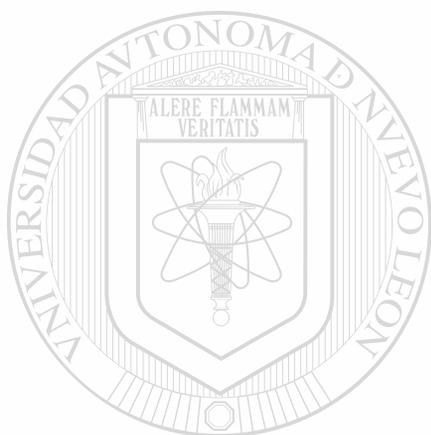
Figura 7. Método de purificación del producto amplificado con enzimas.

A). Primeramente, se obtiene el producto amplificado de interés utilizando los iniciadores adecuados (flechas rojas). B). Posteriormente, se emplean las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina para eliminar el exceso de iniciadores y nucleótidos de cadena sencilla. C) Finalmente, el producto amplificado queda libre de nucleótidos de cadena sencilla que puedan interferir en la secuenciación.

4.2.4.7 Secuenciación.

La secuenciación de las muestras previamente tratadas se llevó a cabo en el secuenciador automatizado DNA Sequencer 4200 de LICOR.

En la reacción de secuenciación se utilizaron los 10 μ l de producto purificado debido a que la intensidad de la banda observada en el gel de agarosa era débil.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Datos epidemiológicos.

Se recolectaron 42 muestras problema y 50 muestras control de tejido pulmonar embebido en parafina. Las muestras control en su totalidad se obtuvieron a partir de necropsias y la causa de muerte predominante fue de tipo cardiovascular (cardiopatía isquémica). En lo que respecta a los pacientes afectados, el origen de la muestra se hizo a partir de biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF), biopsia transendoscópica y necropsia, como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Procedimientos de obtención de las muestras.

Tipo de procedimiento	No. de muestras	% de muestras
BAAF	22	52.3
Bx. transendoscópica	15	35.7
Necropsia	5	11.9
Total	42	100

BAAF; biopsia por aspiración con aguja fina, Bx; biopsia.

5.2 Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CPCP.

De los 42 pacientes, 7 (17%) fueron mujeres y 35 (83%) hombres. El rango de edad y el antecedente de tabaquismo se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Antecedentes de exposición a tabaquismo y agentes químicos según su distribución por edad y sexo.

Grupo de edad	Sexo		Tabaquismo	Agentes químicos (carbón, plomo, estaño, asbesto, cromo, etc)
	Femenino	Masculino		
Edad productiva (15-64 años)	4	15	19	8
Edad productiva (>65 años)	3	20	22 *	9
n = 42	7 (17%)	35 (83%)	41(97.6%)	17 (40.4%)

*Sólo un caso no presentó el antecedente de tabaquismo en este grupo de edad.

De las muestras recolectadas, 36 (85.7%) correspondieron a tumor primario y 6 (14.2%) a metástasis. De estas últimas, 2 fueron de pleura y 4 de ganglios supraclaviculares.

De acuerdo a su diagnóstico histológico, 27 (64.2%) fueron avendulares, 6 (14.2%) de tipo intermedio y 9 (21.4%) de tipo combinado de células grandes y pequeñas. La organización celular del tipo avendular se observa en la figura 8.

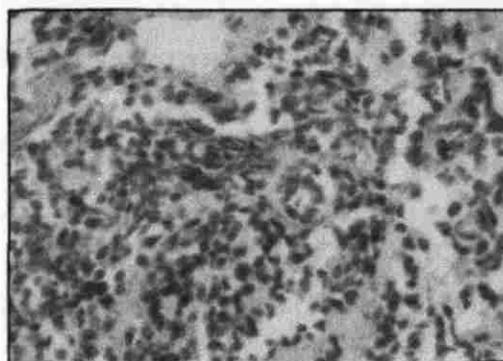


Figura 8. Características histológicas de CPCP subtipo avendular (40X). Neoplasia constituida por células redondas, pequeñas, con núcleos hiper cromáticos, nucleolos ausentes, citoplasma escaso y figuras de mitóticas frecuentes.

5.3 Análisis Inmunohistoquímico.

Se analizó la expresión de 6 marcadores: ACTH, enolasa neuronal específica, cromogranina, citoqueratinas de alto y bajo peso molecular, c-myc y p53.

5.3.1 Expresión de ACTH.

La expresión de ACTH se presentó en 16 casos (38%). De estos, 11 (68.7%) correspondieron al tipo avicular, 2 (12.5%) al intermedio y 3 (18.7%) al combinado (Figura 9).

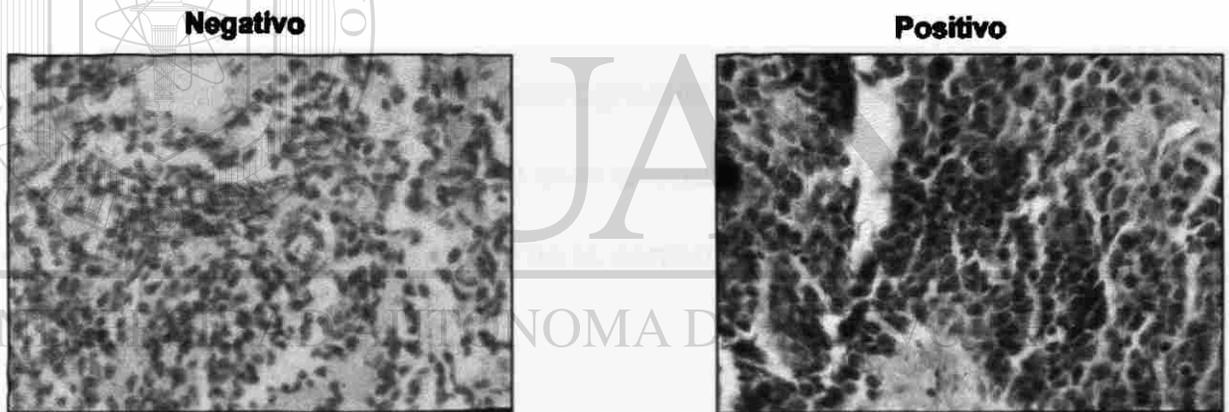


Figura 9. Expresión de ACTH (40x) . Las áreas café marrón indican la presencia del anticuerpo positivo para ACTH.

5.3.2 Expresión de enolasa neuronal específica.

La expresión de enolasa se observó en 22 casos (52.3%), de los cuales 16 (72.7%) correspondieron al tipo avicular, 3 (13.6%) al tipo intermedio y 3 (13.6%) al combinado (Figura 10).

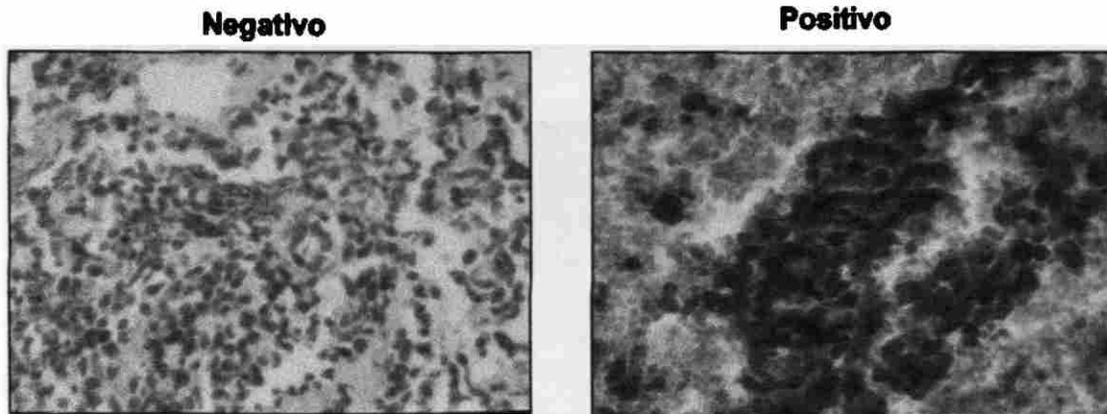


Figura 10. Expresión de enolasa neuronal específica (40X). Las áreas café marrón demuestran la expresión de enolasa.

5.3.3 Expresión de cromogranina.

En cuanto a la expresión de cromogranina, ésta se presentó en 16 de los casos (38%), de los cuales 12 (75%) eran aviculares, 2 (12.5%) fueron del tipo intermedio y 2 (12.5%) correspondieron al combinado (Figura 11).

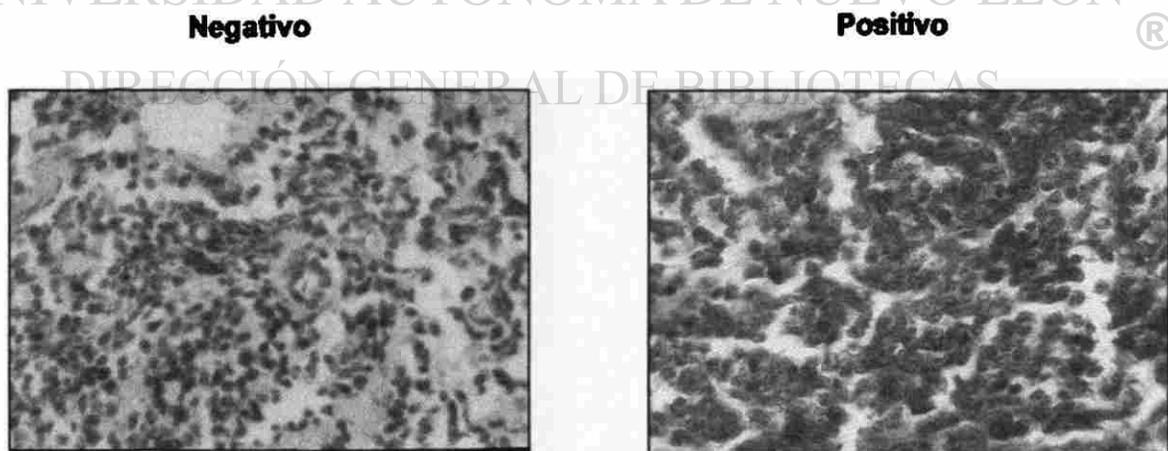


Figura 11. Expresión de Cromogranina (40X). Las áreas café marrón indican la expresión de cromogranina.

5.3.4 Expresión de citoqueratinas.

La expresión de citoqueratinas se presentó en los 42 casos (100%).

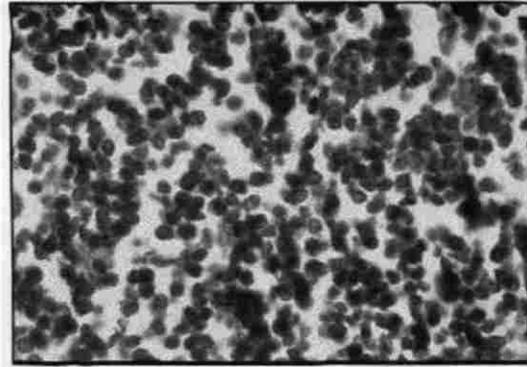


Figura 12. Expresión de citoqueratinas de alto y bajo peso molecular (40X). La expresión en el 100% de los casos demuestra que esta neoplasia es de tipo epitelial.

5.3.5 Expresión de c-myc.

En lo que respecta a la expresión del oncogen c- myc, sólo se observó en 2 (4.7%) casos, los cuales eran del tipo avicular (Figura 13).

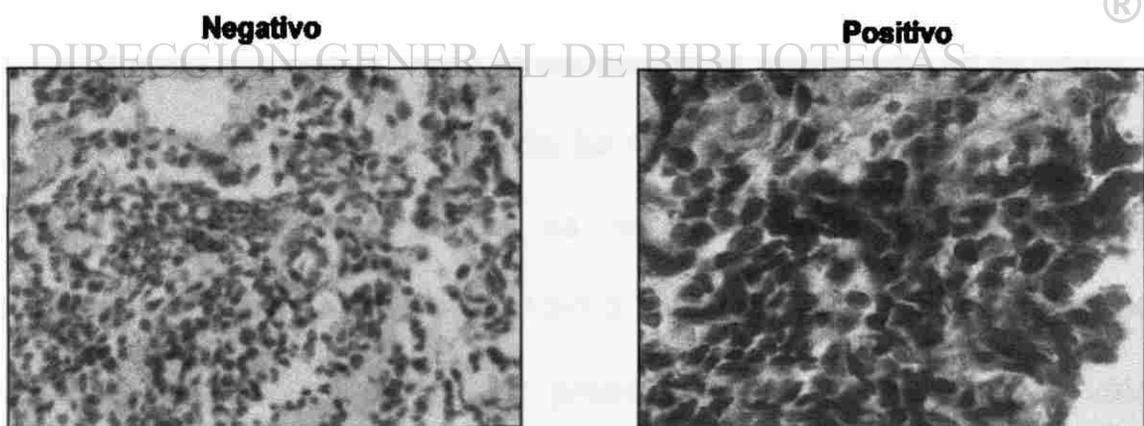


Figura 13. Expresión de c-myc (40X). Áreas café marrón indican positividad focal para c-myc.

5.3.6 Expresión de p53.

La expresión de la proteína p53 se observó en 21 de los casos (50%) de los cuales 14 (2.9%) correspondieron al tipo avicular, 3 (0.63%) al tipo intermedio y 4 (0.84%) al combinado (Figura 14).

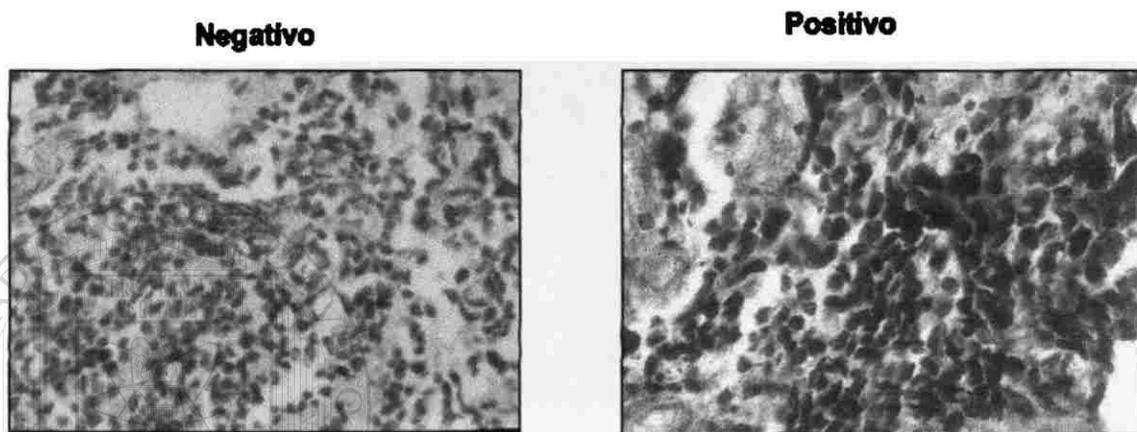


Figura 14. Expresión de p53 (40X). La positividad de p53 se observa en las áreas de color café marrón.

5.4 Análisis Molecular.

5.4.1 Extracción del ADN a partir de las muestras embebidas en parafina.

El banco de ADN se conformó de las 42 muestras de los pacientes y 50 de los controles. La extracción se estandarizó utilizando diferentes concentraciones de proteinasa K (0.3-1.0 mg/ μ l) y diferentes tiempos de incubación considerados por algunos protocolos, para mejorar la extracción (Figura 15).

El ADN extraído presentó un alto grado de degradación, impidiendo su cuantificación adecuada. Por este motivo, su análisis se realizó de inmediato y para tratar de conservarlo, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

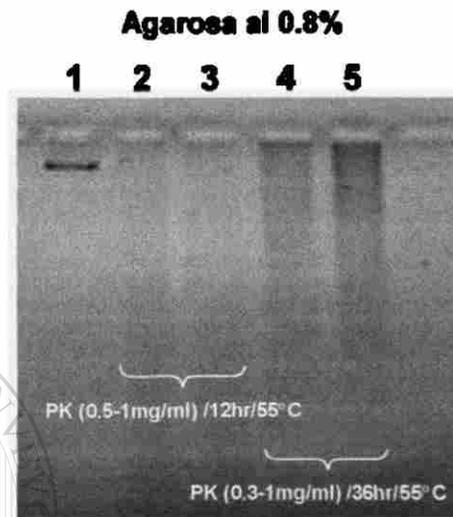


Figura 15. Análisis de ADNs. El carril 1 es un ADN estándar de concentración conocida ($100\text{ ng}/\mu\text{l}$) extraído a partir de sangre con la técnica TSNT. Los carriles 2-5 corresponden a ADNs extraídos de tejido embebido en parafina bajo condiciones diferentes en cuanto a concentración, temperatura y tiempo de incubación de la proteinasa K (PK).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.4.2 Análisis de mutaciones por PCR-heterodúplex.

Una vez que se obtuvo el ADN de cada una de las muestras, tanto de los casos como de los controles, se procedió a estandarizar la reacción para la amplificación de los exones 5-8 del gen p53, para continuar con el análisis por heterodúplex y finalmente, purificar y secuenciar las muestras que resultaron positivas.

5.4.2.1 Análisis del exón 5 de p53.

La estandarización de la amplificación del exón 5 y su análisis por heterodúplex se muestra en la figura 16.

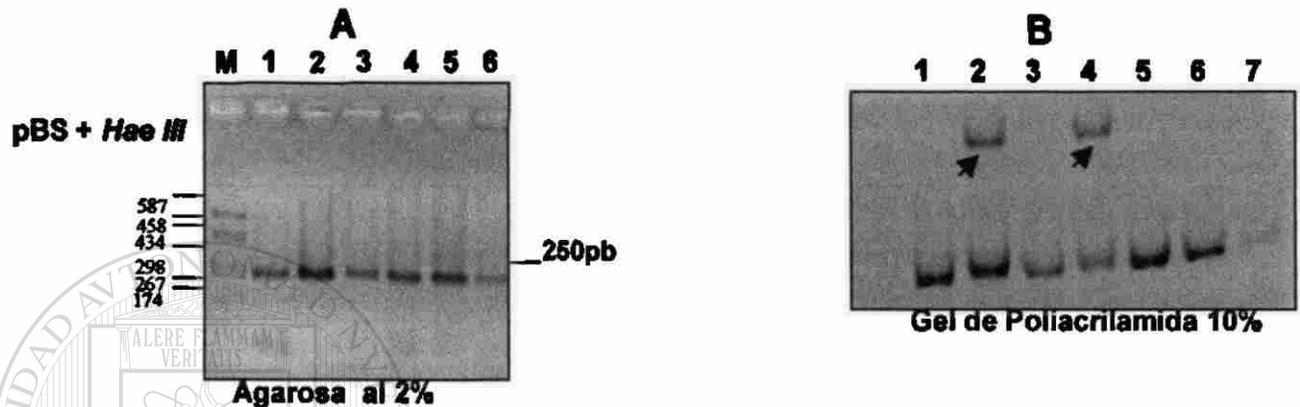


Figura 16. Análisis del exón 5 del gen p53. A) Estandarización de la PCR del exón 5, generando un fragmento de 250pb, B) Análisis del heterodúplex. Se observan homodúplex en los carriles 1, 3, 5, 6 y 7. Las flechas señalan la formación de heterodúplex en los carriles 2 y 4.

La amplificación de este exón se dificultó, por la variabilidad en calidad y cantidad de cada muestra de ADN. En este ensayo se observó la formación de heterodúplex en 5 casos (11.9%), correspondiendo 4 al subtipo avicular y 1 al intermedio.

5.4.2.2 Análisis del exón 6 del gen p53.

La estandarización de la PCR y su análisis por heterodúplex se muestra en la figura 17.

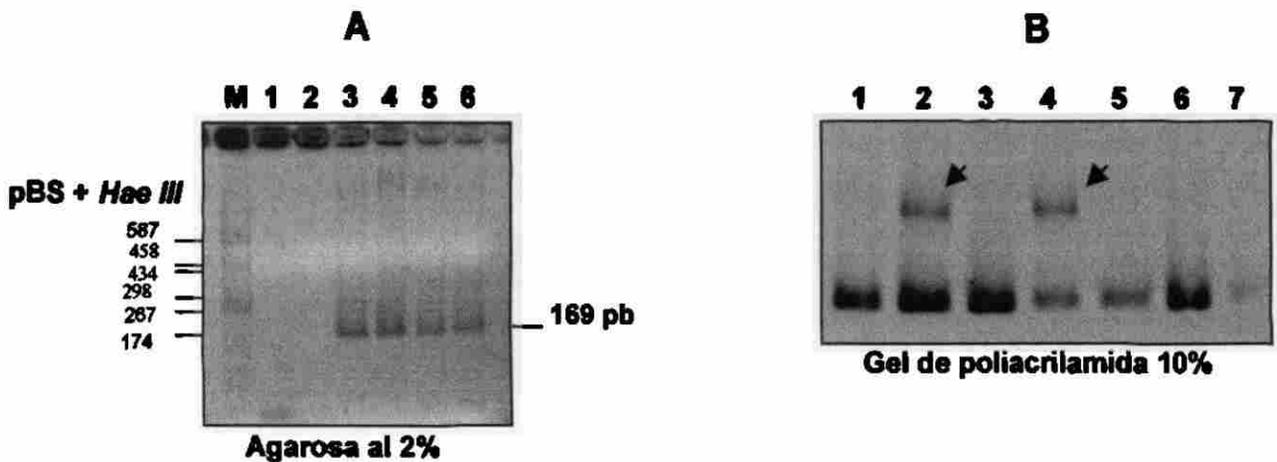


Figura 17. Análisis del exón 6 de p53. A) Estandarización de la PCR del exón 6, generando un fragmento de 169pb. B) Análisis de heterodúplex. Las flechas indican la formación de heterodúplex.

De las 42 muestras analizadas se detectaron 3 variantes (7.1%), de las cuales 2 correspondieron al tipo combinado y una al avelular.

5.4.2.3 Análisis del exón 7 de p53 .

Se analizaron tanto a los controles como a los casos. Primero se llevó a cabo la estandarización de la PCR para el exón 7 y se continuó con el análisis de heterodúplex como se observa en la figura 18.

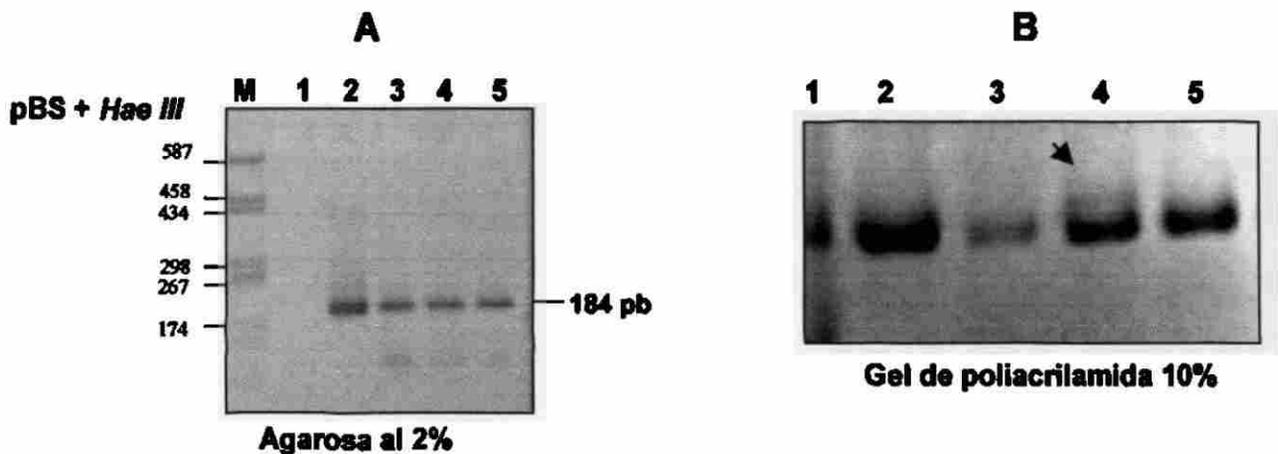


Figura 18. Análisis del exón 7 de p53. A) Estandarización de la PCR del exón 7, generando un fragmento de 184pb. B) Análisis de heterodúplex. La flecha indica la formación de heterodúplex en el carril 4.

En este ensayo se observó la formación de heterodúplex en 2 muestras de pacientes (4.7%) y correspondieron al tipo intermedio.

5.4.2.4 Análisis del exón 8 de p53.

En la figura 19 se muestra la estandarización de la PCR del exón 8 y el análisis de heterodúplex. Cabe mencionar que al igual que el exón 5, se presentó dificultad para amplificar este exón debido a la variabilidad en la calidad y la cantidad de cada una de las muestras como ya se ha mencionado anteriormente.

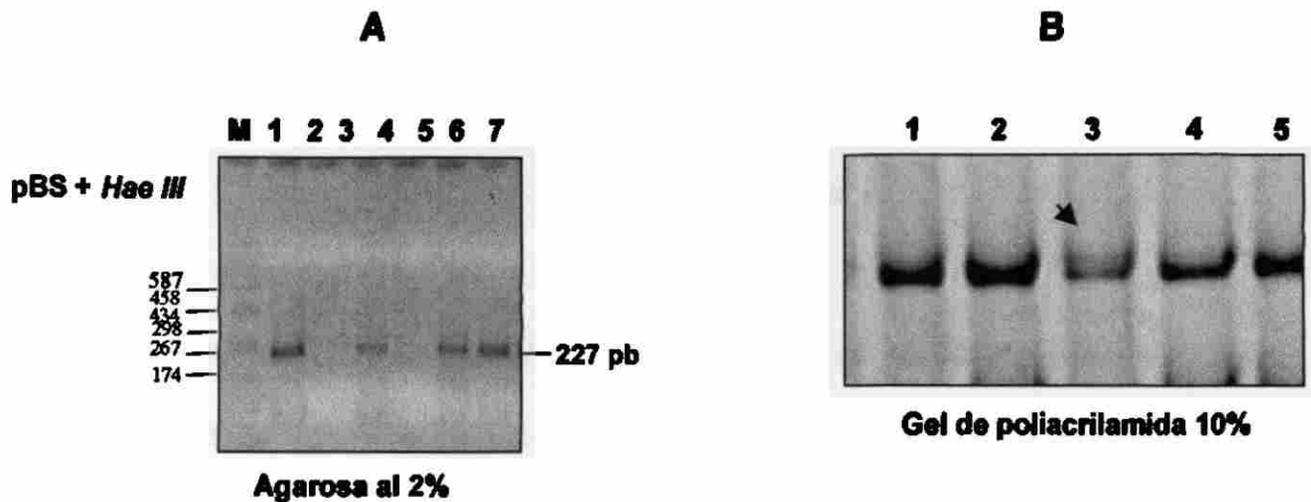


Figura 19. Análisis del exón 8 de p53. A) Estandarización de PCR del exón 8 generando un fragmento de 227pb. B) Análisis de heterodúplex. La flecha señala la formación de heterodúplex.

Para este exón se observó la formación de heterodúplex en 7 casos (16.6%), correspondiendo 5 al tipo avicular y 2 al tipo combinado.

Los resultados obtenidos en cuanto a la frecuencia de variantes para cada exón analizado del gen p53, se muestra en la figura 20.



Figura 20. Frecuencia de variantes del gen p53. Se detectaron 17 variantes (40.4%), de las cuales 5 correspondieron al exón 5 (11.9%), 3 al exón 6 (7.1%), 2 al exón 7 (4.7%) y 7 al exón 8 (16.6%).

5.4.3 Resultados del análisis del gen p53 y sus características clínicas.

De las 42 muestras analizadas con CPCP se detectaron 17 variantes, de los cuales 5 correspondieron al exón 5 (11.9%), 3 al exón 6 (7.1%), 2 al exón 7 (4.7%) y 7 al exón 8 (16.6%).

En la tabla 11 se muestra la relación de las características clínicas e histológicas de las 17 variantes encontradas en p53 por los métodos de PCR-heterodúplex e inmunohistoquímica.

Tabla 11. Resultados de los casos de CPCP.

No. de paciente	Tumor		Variantes de p53	IHQ
	Subtipo CPCP	Sitio	Exón	
54	Avenular	TP	5	+
85	Avenular	TP	5	-
89	Intermedio	TP	5	-
90	Avenular	TP	5	+
104	Avenular	TP	5	+
69	Avenular	TP	6	+
72	Combinado	NL	6	+
73	Combinado	TP	6	+
82	Intermedio	TP	7	-
94	Intermedio	TP	7	+
62	Combinado	TP	8	+
76	Avenular	TP	8	+
83	Avenular	TP	8	+
86	Avenular	TP	8	+
87	Avenular	TP	8	-
88	Combindo	TP	8	+
100	Avenular	NL	8	+

TP, Tumor primario NL, nódulo linfático IHQ, inmunohistoquímica

5.4.4 Concordancia de Inmunohistoquímica y PCR-heterodúplex de p53.

El análisis exhaustivo para la detección de alguna alteración en el gen p53 se efectuó por medio de inmunohistoquímica y heterodúplex; la concordancia de ambos métodos fue del 71.4% como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Concordancia de los métodos de inmunohistoquímica y PCR-heterodúplex.

Inmunohistoquímica	n	PCR-heterodúplex	
		Positivo	Negativo
Positivo	21	13(62%)	8(38%)
Negativo	21	4(19%)	17(81%)

La concordancia fue del 71.4%.

5.4.5 Secuenciación.

Este estudio no proporcionó ningún resultado, debido a que la pobre cantidad y calidad de ADN obtenido de las muestras incluidas en parafina, no fue la suficiente para realizar este tipo de estudio, aunque se permitió el análisis de heterodúplex como ya se mencionó anteriormente.

Es importante aclarar, que se excluye que el proceso de secuenciación haya afectado de alguna manera la obtención de nuestros resultados en lo que respecta a las muestras de ADN positivas para heterodúplex, pues la secuenciación de las muestras control fue positiva en los ensayos realizados.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron algunas de las alteraciones moleculares que pueden estar implicadas en cáncer de células pequeñas del pulmón, en una muestra de 42 casos y 50 controles. Los marcadores de alteración molecular estudiados comprendieron el gen y la proteína tumor supresora p53, la proteína del proto-oncogen c-myc y los otros marcadores que permiten la clasificación histológica del tumor (ACTH, enolasa, cromogranina y citoqueratinas). Este trabajo arroja resultados interesantes sobre la exposición a tabaquismo y daño en p53, sobre la necesidad de realizar estudios moleculares e inmunohistoquímicos para determinar el daño del gen p53 y sobre la utilidad de los otros biomarcadores moleculares para CPCP. La estandarización de las metodologías requeridas para la realización de este estudio queda disponible para ser ofrecida a los especialistas que tratan a pacientes con este tipo de cáncer.

La pérdida de la función de genes supresores de tumor juegan un papel en la evolución del CP^{31,33}. Entre estos, la inactivación del gen supresor p53 localizado en el cromosoma 17p ha constituido un evento clave en el desarrollo del CP⁵¹⁻⁵⁸. La incidencia reportada de mutaciones en p53 varía en rangos

desde un 45% hasta un 80%⁵¹⁻⁵⁴. Estos datos, son principalmente de especímenes quirúrgicos de tumores primarios y de líneas celulares, mientras que nuestro estudio es uno de los pocos realizados a partir de tejido post-mortem.

El análisis de las anomalías de p53 mediante inmunohistoquímica y estudios moleculares principalmente por PCR-SSCP han sido ampliamente utilizados^{57,72-75}, aunque no siempre son concordantes. Nosotros identificamos 17 variantes anormales de p53 de 42 muestras (40.4%) mediante PCR-heterodúplex, frecuencia de alteración baja a lo descrito en otros estudios de CPCP^{51-58,70-72}.

Las posibles explicaciones de estas diferencias entre nuestros resultados y los estudios previos en CPCP incluyen: el tamaño de la muestra analizada con respecto a las reportadas en estudios previos (≤ 28 tumores primarios de CPCP), el análisis de codones fuera de los exones 5-9 en algunos estudios y el tipo de espécimen (cultivo celular, tejido fresco) que tiene gran importancia en lo que respecta a la calidad del ADN.

Mediante inmunohistoquímica detectamos expresión de p53 en 21 casos (50%), similar a lo ya descrito^{72-78,81,84}. A pesar de ser un método de análisis rápido, su interpretación permanece siendo controversial¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Por ejemplo, las deleciones e inserciones provocan que el ARN mensajero de p53 este truncado y por lo tanto procesará una proteína, de tamaño corto que puede ser detectada por inmunohistoquímica a pesar de la alteración. Comúnmente, los

anticuerpos disponibles para p53 se basan en la estabilidad de la proteína, la cual resulta estable en la mayoría de los casos en que la alteración funcional del gen p53 es debida a una mutación puntual. Además, la sobre-expresión de p53 también puede ser producida por un alto índice de traducción en respuesta al daño del ADN, indicando un esfuerzo funcional del gen para mantener el arresto del ciclo celular o para iniciar la apoptosis en las células afectadas²⁴. De igual manera, alteraciones en la vía de señalización de p53, se encuentran la formación de complejos de proteína-proteína entre p53 silvestre y mdm2 que la estabilizan. En esta situación, las proteínas normales se acumulan en el núcleo y son detectadas por IHQ resultando en falsos positivos¹⁰¹. En conclusión, la detección de p53 por inmunohistoquímica, no implica necesariamente que la proteína sea anormal.

Al analizar ambos métodos se presenta una concordancia del 71.4%, lo cual presume que sólo el 62% de las proteínas están mutadas (ver tabla 12) y resalta la importancia de utilizar conjuntamente los dos métodos para aumentar la sensibilidad en el análisis de las anomalías de p53.

Ninguna alteración de p53 fue detectada en las muestras controles sin antecedente de tabaquismo o exposición a carcinógenos, por el contrario en un 95.2% de las muestras problema presentaban principalmente el antecedente de tabaquismo, lo cual sugiere que las alteraciones son adquiridas somáticamente.

Los marcadores neuroendócrinos como enolasa neuronal específica y cromogranina se presentaron en sólo el 35.5% y en el 52.2% de las muestras problema respectivamente, muy semejante a lo ya descrito⁷⁶⁻⁷⁹. La enolasa tiene gran importancia pronóstica, ya que se correlaciona con la extensión, la respuesta a tratamiento y la sobrevida⁸⁰. Una de las hormonas que con mayor frecuencia se encuentra en el CPCP, es la ACTH la cual se presentó en un 35.5% ligeramente mayor a lo descrito previamente (30%)⁷⁶⁻⁷⁹.

Según estudios reportados c-myc se encuentra sobre-expresado en un 10-20% o más en el CPCP. En nuestro estudio, c-myc se encontró con muy bajo porcentaje de expresión (4.7%)⁴³⁻⁴⁵, lo cual consideramos que dentro de los factores que interfirieron fue la baja celularidad y la heterogeneidad de cada muestra analizada.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Con este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. La presencia de los marcadores analizados por inmunohistoquímica en las muestras con CPCP fué muy similar a lo ya descrito, excepto para c-myc, el cuál se encontró muy bajo porcentaje de expresión (4.7%).
2. Mediante el análisis molecular de p53 se identificaron 17 variantes (40.4%) y su concordancia con los resultados de inmunohistoquímica fué del 71.4%.
Esto indica que la presencia de las proteínas detectables por inmunohistoquímica no es confirmatoria de su normalidad, ya que se puede presumir que 62% de las proteínas detectadas están mutadas.
3. Ambos métodos para el estudio de p53 deben ser utilizados conjuntamente para aumentar la sensibilidad en la detección de anomalías en este gen y su proteína, dada su importancia en el diagnóstico, pronóstico, terapéutico y evolución del tumor.
4. Se logró estandarizar la extracción de ADN genómico y establecer un banco genómico a partir del material pulmonar embebido en parafina, así como también, se lograron estandarizar las condiciones en la técnica de PCR-heterodúplex.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Minna JD.** Neoplasms of the Lung. En: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14va. Edición. McGraw-Hill. NewYork, EUA. 1999; 552-562.
- 2. Macías MC.** Panorama Epidemiológico del Cáncer Pulmonar. *Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. 1995; 26: 12:1-2,
- 3. Estadísticas Vitales.** INEGI, SSA/DGEI, 1998.
<http://www.ssa.gob.mx/dgei/vitales/cuadro4.html>
- 4. Registro Histopatológico de Neoplasias en México, DGE/SSA, 1999.**
- 5. WHO:** Histological Typing of Lung Tumors, 2da. Edición, Ginebra. WHO, 1981.
- 6. Kern JA, Clamon G.** Lung Cancer. En *Textbook of Internal Medicine*. William N. Kelley (editor). 3ra. Edición. Lippincott-Raven. Philadelphia, EUA. 1997; 2047-2058.
- 7. Kern JA, McLennan G.** Genetic and Molecular Changes of Human Lung Cancer. En: *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. Fishman PA(editor). 3ra. Edición. International. EUA. 1998; 1695-1717.

8. **Kobzik L.** The Lung. En: *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL (editors). 6ta. Edición. W B Saunders Co. Philadelphia, EUA. 1999; 697-755.
9. **Buccheri G.** Tumor Markers: Clinical meaning and use. En: *Lung Tumors*. Brambilla C., Brambilla E (Editores). Marcel Dekker, Inc. New York. 1999;435-451.
10. **Barbareschi M, Girlando S, Mauri F, Arrigoni G, Laurino L, Dalla PP, Doglioni C.** Tumor supresor gene products, proliferation, and differentiation markers in lung neuroendocrine neoplasms. *J Pathol.* 1992; 166: 343-350.
11. **Hasleton PS.** *Spencer's Pathology of the lung*. 5. Unites States of America. McGraw Hill. 1996.
12. **Kodama K, Kaneko M, Aida M.** Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer Res.* 1997;17: 433.
13. **Zang L-Y, Stone K, Pryor WA.** Detection of free radicals in extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.* 1995;19: 161.
14. **Pryor WA.** Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environ Health Perspect.* 1997; 105:875.
15. **Evans MD, Pryor WA.** An invited review: cigarette smoking, emphysema and damage to alpha-1-proteinase inhibitor. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 10).* 1994; 266:L593.
16. **Lapenna D, Mezzetti A, De Gioia S.** Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:849.

17. Ueyama K, Yokode M, Arai H. Cholesterol efflux effect of high-density lipoprotein is impaired by whole cigarette smoke extracts through lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:182.
18. Cook RM, Miller YE, Bunn PA. Small cell lung cancer: etiology, biology, clinical, features, staging, and treatment. *Current Problems in Cancer: Small cell Lung Cancer: Etiology, Biology, Clinical Features, Staging, and Treatment.* 1993;17:76-141.
19. Mazur M, Glickman BW. Sequence specificity of mutations induced by benzo[a]pyrene-7diol-9,10-epoxide at endogenous *aprt* gene in CHO cells. *Somat Cell Mol. Genet.* 1988;14:393-400.
20. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996;274:430-432.
21. Eckert KA, Ingle CA, Drinkwater NR. N-Ethyl-N-nitrosourea induces A:T to C:G transversion mutations as well as transition mutations in SOS-induced *Escherichia coli*. *Carcinogenesis.* 1989;10:2261-2267.
22. Lawley P. N-Nitroso Compounds. En: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I.* Berlin: Springer Verlag. 1990; 409-469.
23. Sorensen M, Lassen U, Hassen HH. Current therapy of small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 1998;10:133-138.

24. Kandioler DE, Kappel S, Mittlböck M, Dekan G, Ludwig C, Janschek E, Pirker R, Wolner E, Eckersberger F. The TP53 genotype but not immunohistochemical result is predictive of response to cisplatin-based neoadjuvant therapy in stage III Non- small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* .1999; 117:744-750.

25. Harris CC. Structure and function of p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1442-1455.

26. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*.1993;74:957-967.

27. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 1993;362:847-852.

28. Peña CE, Carter DE, Ayala FF. Toxicología Ambiental. En; *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Superfund, Basic Research Program, Center for toxicology, Tucson, Arizona, E.U. 2000;54-67.

29. Giaccone G. Oncogenes and antioncogenes in lung tumorigenesis. *Chest*. 1996;109:130S-134S.

30. Soussi T, Tredaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsh A. The p53 tumor suppressor gene in lung cancer: from molecular to serological diagnosis. En:

Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention. Birkhäuser Verlag
Basel. Switzerland. 1998;221-272.

31. Ishida T, Carbone DP. Updates in Advances in Lung Cancer. *Prog Respir Res*. Basel, Karger. 1997;29:173-186.

32. Rosvold, E. Genetic and Molecular events in the pathogenesis of Lung cancer. *Current Problems in Cancer*. Newer Aspects in the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Non-small Cell Lung Cancer Part II. Linn, Missouri, United States of America: Ed. Mosby, 1996. Vol XX .No. 4 :249-265, 273-278.

33. Mabry M, Nelkin BD, Baylin SB. Lung Cancer. En: *The genetic basis of human cancer*. Vogelstein B, Kinzler KW (Editores). Mc Graw-Hill. EUA. 1998;671-679.

34. Whang PJ, Bunn PA Jr, Kao-Shan CS, Lee EC, Carney DN, Gazdar A, Minna JD. A nonrandom chromosomal abnormality, del 3p (14-23), in human small cell lung cancer (SCLC). *Cancer Genet. Cytogenet.* 1982; 6:119-134.

35. Whang PJ, Kao-Shan CS, Lee EC, Bunn PA Jr, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Specific chromosome defect associated with human small-cell cancer: deletion 3p (14-23). *Science*. 1982; 215: 181-182.

36. Kovatich A, Friedland DM, Druck T, Hadaczek P, Huebner K, Comis RL, Hauck W, McCue PA. Molecular alterations to human chromosome 3p loci in neuroendocrine lung tumors. *Cancer* . 1998;83:1109-1117.

37. Wistuba II , Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res.* 2000;60:1949-1960.
38. Yokota J, Wada M, Shimosato Y, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13 and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84: 9252-9256.
39. Carbone DP, Mina JD. The molecular genetics of lung cancer. *Adv Intern Med* 1992; 37:153-171.
40. Rabbitts P, Douglas J, Daly M, Sundaresan V, Fox B, Haselton P, Wells F, Albertson D, Waters J. Frequency and extent of allelic loss in the short arm of chromosome 3 in nonsmall-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1989; 1:95-105.
41. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Genética del cáncer. En: *Genética en Medicina.* Thompson & Thompson. 4ta. Edición. Masson, S.A. España. 1994; 351-366.
42. Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, Linnoila IR. Minna JD, Gadzar AF. Mutations of *ras* genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene.* 1991; 6: 1353-1362.

- 43. Johnson B, Makuch R, Simmons A, Garzdar A, Burch D, Cashell A.** myc family DNA amplification in small cell lung cancer patients tumors and corresponding cell lines. *Cancer Res.* 1988;79:5163-5166.
- 44. Salgia R, Skarin AT.** Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16:1207-1217.
- 45. Barr LF, Campbell SE, Diette GB, Gabrielson EW, Kim S, Shim H, Dang CV.** c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 2000;60:143-149.
- 46. Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, Williams WV, Cohen JA, Kern JA.** Expression of the neu gene-encoded protein (p185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1990;50:421-425.
- 47. Shirohani T, Hiyama K, Ishioka S, Inyaku K, Awaya Y, Yonchara S, Yoshida Y, Inai K, Hiyama E, Hasegawa K.** Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer.* 1994;11:29-41.
- 48. Adams J, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322-1325.
- 49. Yann JJ, Chen FF, Tsai YC, Jin YT.** Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein in small cell lung carcinomas. *Oncology.* 1996;53:6-11.

- 50. Harbour JW, Lai SL, Whang PJ, Gadzar AF, Minna JD, Kaye FJ.** Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*. 1988;241:353-357.
- 51. Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R.** The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene*. 1991;6:1775-1778.
- 52. Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P.** p53 mutations in primary human lung tumors and their metastases. *Mol Carcinog*. 1994;9:105-109.
- 53. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.** Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994;54:4855-4878.
- 54. D'Ámico D, Carbone D, Mitsudomi T, Nau M, Fedorko J, Russell E, Johnson B, Buchhagen D, Bodner S, Phelps R, Gadzar A, Minna JD.** High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene*. 1992;7:339-346.
- 55. Castillo PE, Prada AJ, Rodríguez VL, Vargas CC.** p53, Gen Supresor de Tumor. *MEDICAS UIS*. 1999;13:226-32.
- 56. Lohman D, Putz B, Reich U, Bohm J, Prauer H, Hofler H.** Mutational spectrum of the p53 gene in human small-cell lung cancer and relationship to clinicopathological data. *Am J Pathol*. 1993;142(3):907-915.

57. Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL. Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer. *Oncogene*. 1991;6(6):1067-1071.
58. Tseng JE, Rodriguez M, Ro J, Liu D, Ki HW, Mao L. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5666-5670.
59. Koshland DE Jr. Molecule of the year. *Science*. 1993;262(5142):1953.
60. McBride OW, Merry D, Oren M, et al. Human p53 cellular tumor antigen is on chromosome 17p13. *Cytogenet. Cell genet* .1985;40:694-695.
61. Benchimol S, Lam P, Crawford LV, et al. Transformation Associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet*. 1995;11(5):505-510.
62. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci* .1988;85(14):5146-5150.
63. Vogelstein B, Kinzler KW. Tumor suppressor gene. X-rays strike p53 again. *Nature*. 1994;370:174-175.
64. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*. 1991;351:453-456.
65. Clurman B, Groudine M. Tumor-suppressor genes: Killer in search of a motive?. *Nature*. 1997;389:122-123.

- 66. Jost C, Marin M, Kaelin Jr W. P53 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997;389:191-194.**
- 67. Yin Y, Terauchi Y, Solomom G et al. Involvement of p85 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress. *Nature*.1998;391:707-710.**
- 68. Wyllie A. Apoptosis: clues in the p53 murder mystery. *Nature*.1997;389:237-238.**
- 69. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell*. 1992;70(4):523-526.**
- 70. Sameshima Y, Matsuno Y, Hirohashi S, et al. Alternations of the p53 gene are common and critical events for the maintenance of malignant phenotypes in small-cell lung carcinoma. *Oncogene*. 1992;7:451-457.**
- 71. Miller CW, Simon K, Aslo A. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*. 1991;52:1695-1698.**
- 72. Fujino M, Dosaka AH, Kato M, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y. Simultaneous use of the PCR-SSCP method and Immunohistochemistry for increasing the detection efficacy of p53 abnormalities in human lung cancer. *Am J Clin Pathol*. 1995;104:319-324.**
- 73. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet*. 1990;335:675-79.**
- 74. D' Amico TA, Massey M, Herdon JE, Moore MB, Harpole DH. A biologic risk model for stage I lung cancer : Immunohistochemical analysis of 408**

patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:736-743.

75. Dowel SP, Wilson POG, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res.* 1994;54:4855-4878.

76. Addis BJ, Hamid Q, Ibrahim N, Fahey M, Bloom SR, Polak JM. Immunohistochemical markers of small cell carcinoma and related neuroendocrine tumours of the lung. *J Pathol.* 1987;153:137-150.

77. Barbareschi M, Tison V, Ferrero S, et al. The problem of atypical carcinoid and other unusual neuroendocrine tumors. *Cancer Therapy and Control.* 1992;2:103-121.

78. Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest.* 1993;103:449S-456S.

79. Seckl MJ, Rozengurt. Neuropeptides, signal transduction and small cell lung cancer. En: *Clinical and biological basis of lung cancer prevention.* Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1998; 129-142.

80. Bonner JA, Sloan JA, Kendrith MR, Klee GG, Kugler JW, Mailliard JA, Wiesenfeld M, Krook JE, Maksymium AW, Shaw EG, et al. Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:597-601.

- 81. Tsai CM, Chang KT, Perng RP.** Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J Natl Cancer Inst* .1993;85:897-901.
- 82. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A.** p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994;266:807-810.
- 83. Greatens TM, Niehans GA, Rubins JB, Jessurun J, Kratzke A, Maddaus MA, Niewoehner DE.** Do molecular markers predict survival in non-small cell lung cancer ?. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1093-1097.
- 84. Kawasaki M, Nakanishi Y, Kuwano K, Yatsunami J, Takayama K, Hara N.** The utility of p53 immunostaining of transbronchial biopsy specimens of lung cancer: p53 overexpression predicts poor prognosis and chemoresistance in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1195-1200.
- 85. Hickman JA,** Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*. 1992;11:121-139.
- 86. Mobley SR, Liu TJ, Hudson M, et al.** In vitro growth suppression by adenoviral transduction of p21 and p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ach Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;124:88-92.
- 87. Clayman GL, Liu TJ, Overholt SM, et al.** Gene therapy for head and neck cancer. *Ach Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;122:489-493.
- 88. Gottesman MM.** Report of a meeting: molecular basis of cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:1277-1285.

89. Chang EH, Jang YJ, Hao Z, et al. Restoration of the G1 checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild-type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123:507-512.
90. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med.* 1996; 2: 985-991.
91. Zou Y, Zong G, Ling YH, et al. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1130-1137.
92. Scheule RK. Gene therapy for lung cancer-an application for cationic lipid-mediated gene delivery?. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1118-1119.
93. Mahmoud S, Staley J, Taylor J, Bogden A, Moreau JP, Coy D, Avis I, Cuttitta F, Mulshine JL, Moody TW. Bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 1991;51:1798-1802.
94. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic, prees. San Diego, Ca, EU. 1990;153-158.
95. *Armed Forces Institute of Pathology.* Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, 1997; 81-83.
96. Faille A, De Cremoux P, Extra J.M, Linares G, Espie M, Bourstyn E, De Rocquancourt A, Giacchetti S, Marty M & Calvo F. p53 mutations and

overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer*.

1994;25:1145-1150.

97. Buchman L, Chumakov PM, Ninikina NN, Samarina OP & Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*. 1988;70:245-252.

98. Tsongalis JG, Kaufmann KW, Wilson JS, Friedman JK, Silverman ML. Rapid screening for p53 mutations with a sensitive heteroduplex detection technique. *Clin Chemistry*. 1994;40(3):485-486.

99. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature genetics*. 1993;5:111-1117.

100. Fisher CJ, Gillet CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer*. 1994;69:26-31.

101. Wynford TD. P53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J pathol*. 1992;166:329-30.

CAPÍTULO IX

ANEXO 1

"ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A CÁNCER PULMONAR DE CELULAS PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MÉXICO"

Marcar con una cruz las respuestas de cada pregunta.

DATOS DEMOGRÁFICOS:

1. Nombre: _____
2. No. de expediente: _____
3. No. de registro en Patología: _____
4. Edad (años cumplidos) al momento de diagnóstico: _____
5. Sexo: a) Hombre b) Mujer
6. Ocupación: _____
7. Tiempo en dicha ocupación: _____
8. Antecedente ocupacional de exposición a níquel, asbesto, cromo, cadmio u otro agente químico.
a) Sí b) No Especifique _____

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES:

9. Antecedentes de cáncer pulmonar en la familia.
a) Sí, quién _____ b) No
10. Antecedente de algún otro cáncer.
a) Sí, quién _____ b) No
11. Si la respuesta es afirmatoria mencione que tipo de cáncer es? _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS:

12. Antecedente de tabaquismo a) Si b) No
13. En caso de ser positivo mencionar , el promedio de cigarrillos por día.
[1 cajetilla = 20 cigarrillos] _____ cigarrillos/día
14. En promedio cuántos años mantuvo el tabaquismo : _____ años

15. Antecedente de haber suspendido el tabaquismo previamente al dx.
a) Si, hace cuanto _____ b) No

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS:

16. Antecedente de alguna enfermedad crónica (> 2 semanas):
a) Sí, especifique _____ b) No
17. Antecedente de algún otro cáncer:
a) Sí, que tipo de neoplasia _____ b) No
18. Antecedente de quimio o radioterapia en el manejo de SCLC
a) Sí b) No
19. Observaciones adicionales:
-
-
-

Solo para el investigador.

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO PARA CPCP:

20. Subtipo histológico:
a) Células avendulares
b) Células intermedias
c) Células avendulares combinadas

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO:

Análisis de Oncogenes:

21. Presencia de c- myc a) Sí b) No
22. Presencia de p53 a) Sí b) No

Análisis de marcadores de diferenciación:

23. Presencia de citoqueratina a) Sí b) No
24. Presencia de cromogranina A a) Sí b) No
25. Presencia de ACTH a) Sí b) No
26. Presencia de enolasa a) Sí b) No

ANÁLISIS MOLECULAR:

Análisis del gen supresor de tumor p53:

27. Heterodúplex p 53 (Exón 5): a) Normal b) Variante
28. Heterodúplex p 53 (Exón 6): a) Normal b) Variante
29. Heterodúplex p 53 (Exón 7): a) Normal b) Variante
30. Heterodúplex p 53 (Exón 8): a) Normal b) Variante

CAPÍTULO X

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Nancy Elena Guzmán Delgado

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería

Genética.

Tesis: ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A CÁNCER PULMONAR DE CÉLULAS PEQUEÑAS EN EL NORESTE DE MÉXICO.

Campo de estudio: Diagnóstico Molecular.

Biografía: Nacida en Mexicali, Baja California Norte, el 7 de Febrero de 1972,

hija de Miguel Guzmán Ruiz y Severa Delgado Deras.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de Mexicali de la Universidad

Autónoma de Baja California. Grado obtenido: Médico Cirujano y

Partero en 1997.

