

**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

TM
RC280

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

88

M.C.P. NANCY ELNA GUZMAN DELGADO



1080113107

231857

TM

RC280

.L8

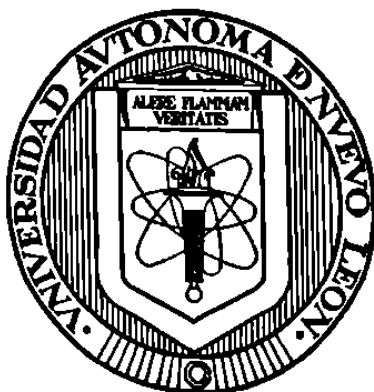
C8

c 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR:

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.

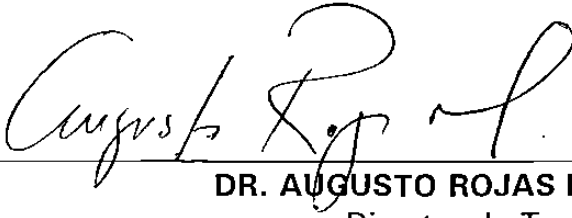
A mis compañeros de generación (grupo de los 12): Malena, Lety Aurelio, Prisco, Polo, Lulú, Clarisa, Virgilio, Sergio, Itzel y Mauricio. Por su amistad y ayuda durante toda la maestría.

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.

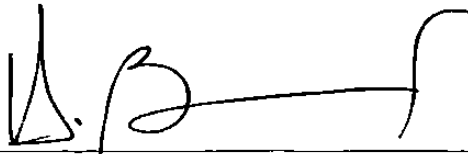
A todos mis amigos en especial a Pilar y Malena que siempre estuvieron en los momentos más difíciles y que me brindaron su cariño y amistad.

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

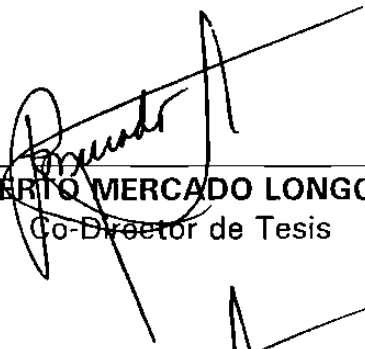
Aprobación de la Tesis:



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

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

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	Hormona 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

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

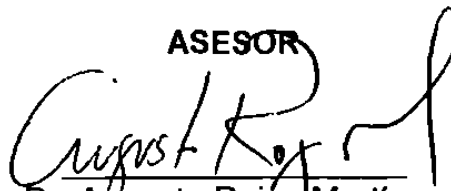
Área de estudio: Diagnóstico Molecular

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



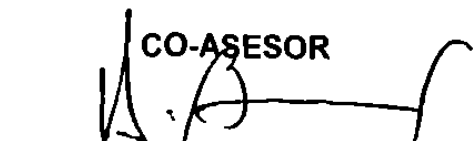
Dr. Augusto Rojas Martínez

ASESOR EXTERNO



Dr. Horacio Decanini Arcaute

CO-ASESOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña