

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 (CACP) y el de células no pequeñas (CCNP). Este último se divide en los tipos epidermoide, adenocarcinoma y el cáncer de células grandes¹.

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 neurosecretores 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

90% de las neoplasias pulmonares son atribuibles a este hábito. Este antecedente es particularmente común en el CPCP ^{1,6,7}.

El riesgo relativo de padecer cáncer pulmonar es 10 a 13 veces mayor en varones fumadores que en los no fumadores y se ha observado una estrecha relación con el número de cigarrillos fumados durante el día, el tipo de cigarrillos, la edad de inicio y el tiempo de mantener el tabaquismo ^{1,6,7,11}. El riesgo relativo en fumadores pasivos es 1.5 veces mayor que en los no expuestos¹.

La importancia del tabaquismo en la carcinogénesis del CP radica en que se han identificado agentes oxidantes que se encuentran en el humo del cigarrillo (oxidantes con y sin radicales libres), responsables del daño biológico al ADN¹²⁻¹⁴, proteínas¹⁵ y lípidos^{16,17}. De ahí la preocupación de muchos organismos de salud para fomentar la prevención de esta adicción (Figura 1).

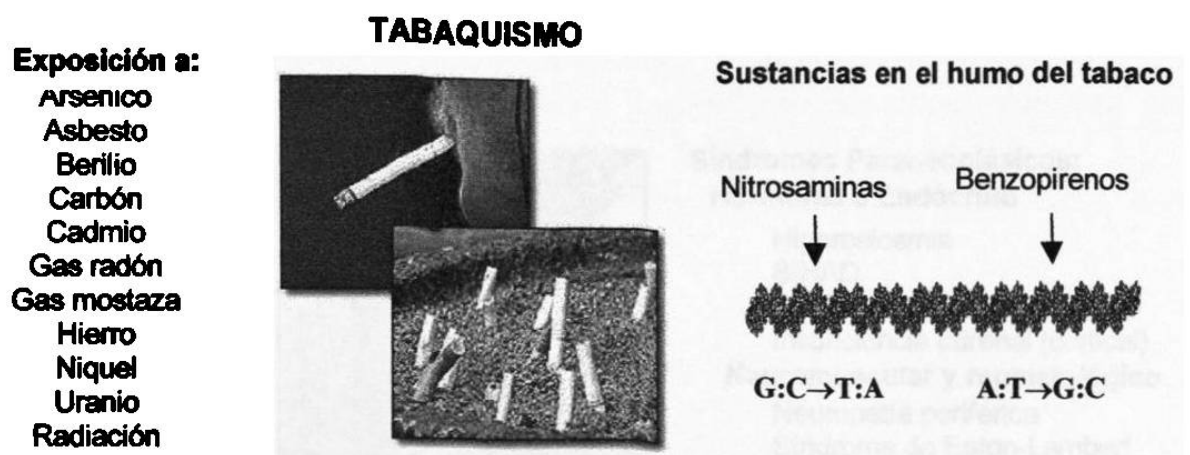


Figura 1. Factores de riesgo de CP. El tabaquismo y la exposición a compuestos químicos tienen un efecto agonista para desarrollar CP^{7,10}. Los benzopirenos y las nitrosaminas presentes en el humo del cigarrillo generan transversiones G-T y A-G, respectivamente¹⁹⁻²².

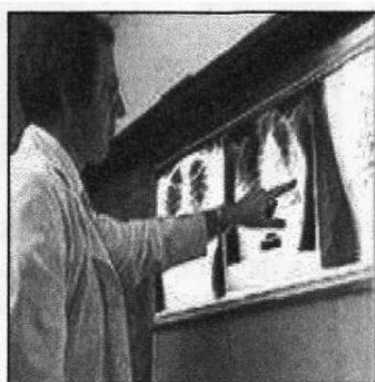
1.1.5 Cuadro Clínico, Pronóstico y Tratamiento.

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 enfermedad⁶⁻⁹ (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}.

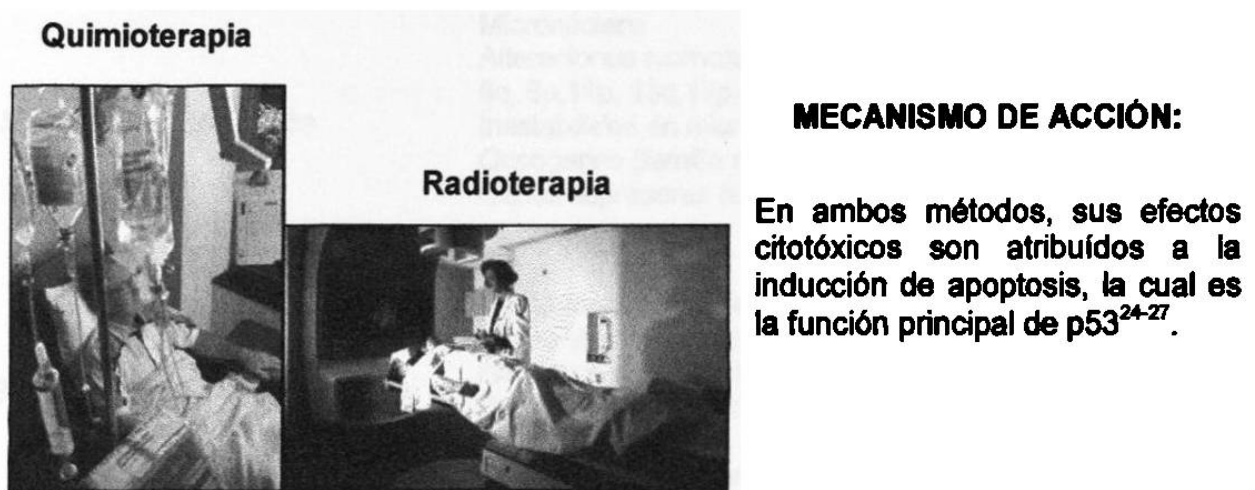


Figura 3. Métodos de tratamiento para CPCP. La piedra angular en el tratamiento es la quimioterapia, pero al igual que la radioterapia existe controversia si la presencia de mutaciones en p53 se relaciona con la resistencia al tratamiento²⁴⁻²⁷.

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 ^{1,10,29-31}

Marcadores Genéticos	<p>Micronúcleos Alteraciones cromosómicas (deleciones o translocaciones en 3p, 5q, 8p, 11p, 13q, 17p) Inestabilidad en microsátélites 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 heterocigidad (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^{1,6,50} 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).

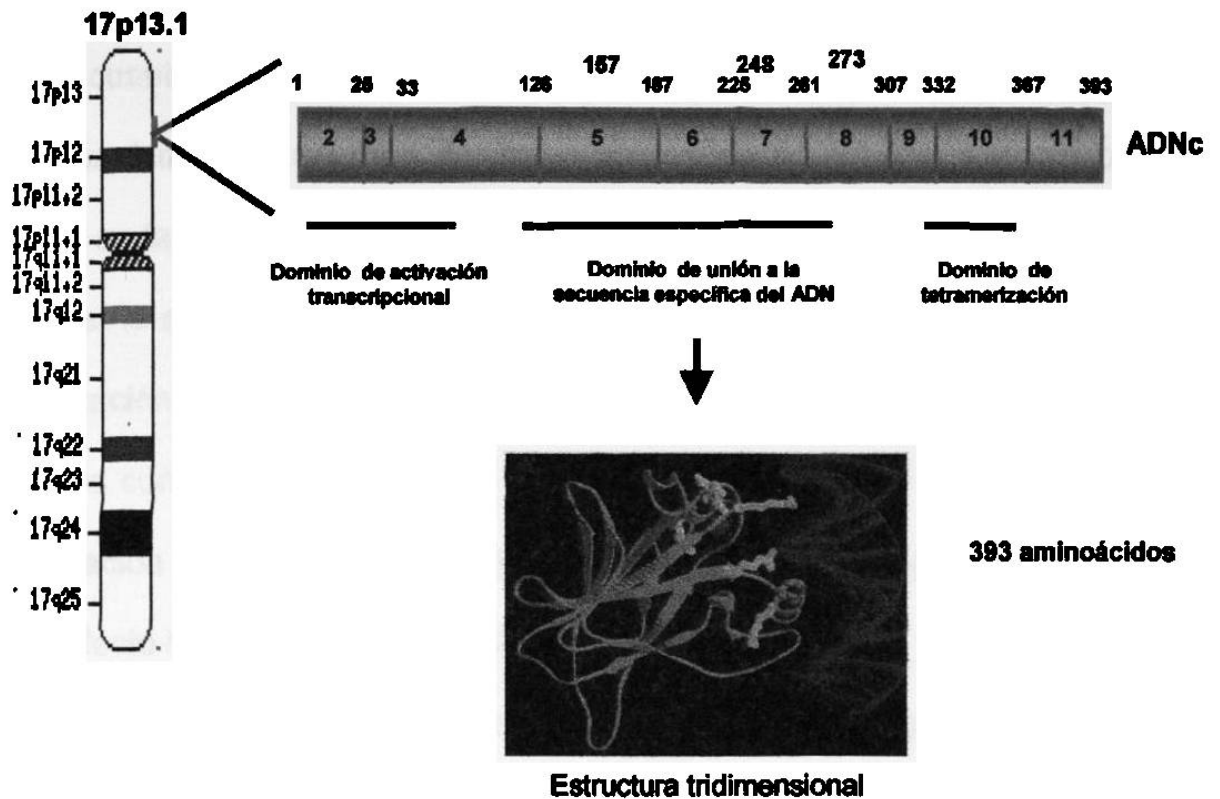


Figura 4. Características de p53. Gen localizado en el cromosoma 17p13.1. Tiene 11 exones (de los cuales el primero no es codificante). La cadena polipeptídica se divide en cuatro regiones, la primera corresponde a los aminoácidos 1-42 que forman el dominio de activación transcripcional que media interacciones 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^{51,52-54,58-58}.

Exón	Codón mutado *
5	128,135,141,142,144,147,151,154,155,157,158,159,167,171,175,176,179
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 esto 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 sobrevida⁸⁰.

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 neoplasia⁸³.

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.

2.2 OBJETIVOS

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).

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 *Autostain 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 período 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)⁹⁴ y por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los E.U. (1997)⁹⁵, 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.

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 tgattgctctt 3' Ex6P53-2 5' cccctcctcccagagacccc 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' tgcaggggtggcaagtggct 3'	52pb río arriba y 24 pb río abajo del exón 7	184	65°C
8	Ex8P53-1 5' ggtaggacctgattcctactgcc 3' Ex8P53-2 5' cccttggctcctccacogctcttg 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 (µl)	Concentración final
Buffer ADN pol Taq 10X	3	1X
Primer sentido 5µM	2	0.3µM
Primer antisentido 5µM	2	0.3µM
MgCl ₂ 25mM	2.4	2mM
dNTPs 10mM	0.9	0.3mM
Taq 5U/µl	0.5	0.08U/µl
ADN	variable	variable
Agua miliQ	Aforar a 30	---
Aceite mineral	1 gota	---

Tabla 8. Condiciones del programa del termociclador.

Paso	Etapa	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.

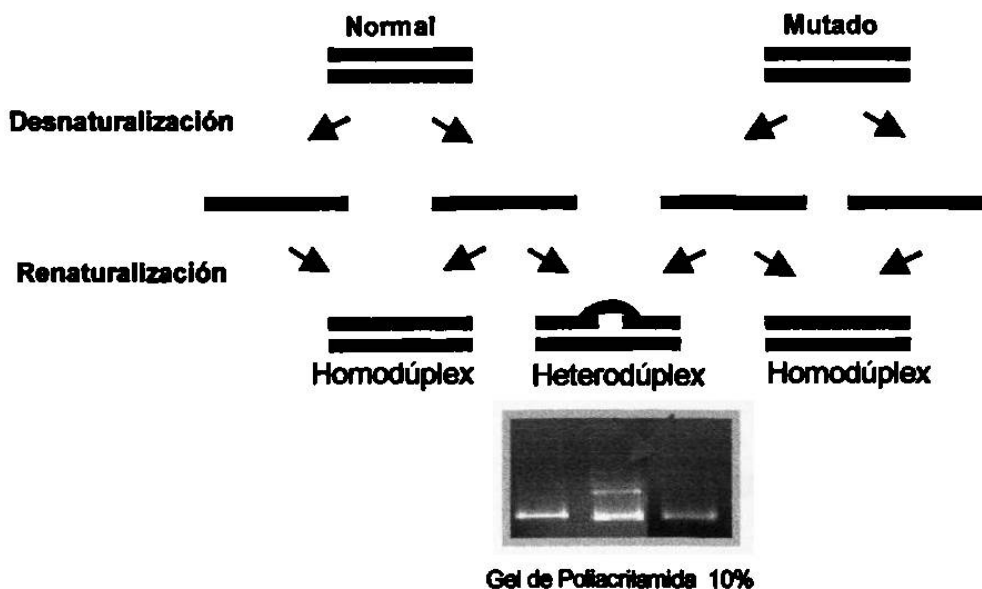


Figura 6. Técnica de análisis por heterodúplex.

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 µg/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 °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 período 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.

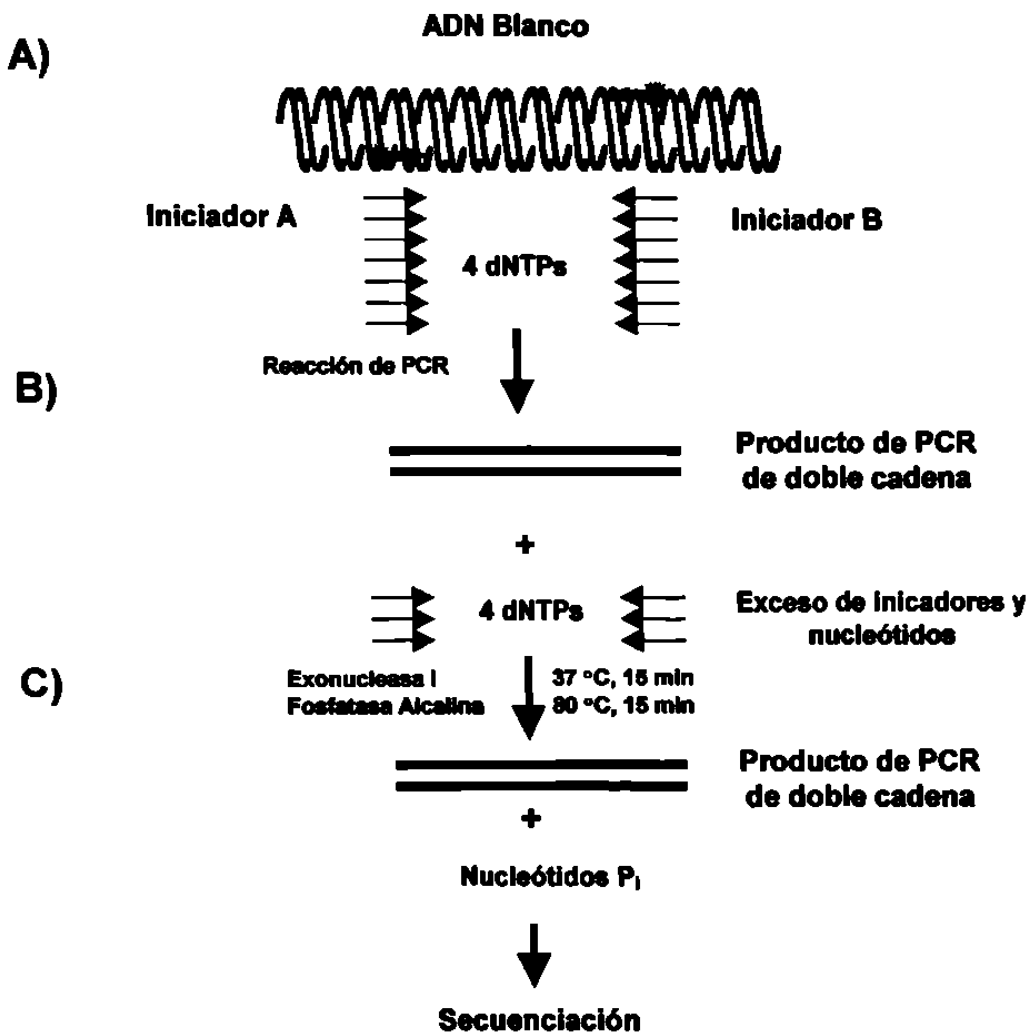


Figura 7. Método de purificación del producto amplificado con enzimas.

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.

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 aviculares, 6 (14.2%) de tipo intermedio y 9 (21.4%) de tipo combinado de células grandes y pequeñas. La organización celular del tipo avicular se observa en la figura 8.

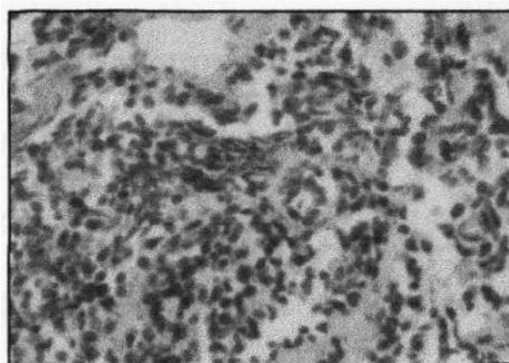


Figura 8. Características histológicas de CPCP subtipo avicular (40X). Neoplasia constituida por células redondas, pequeñas, con núcleos hiper cromáticos, nucleolos ausentes, citoplasma escaso y figuras de mitóticas frecuentes.

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).

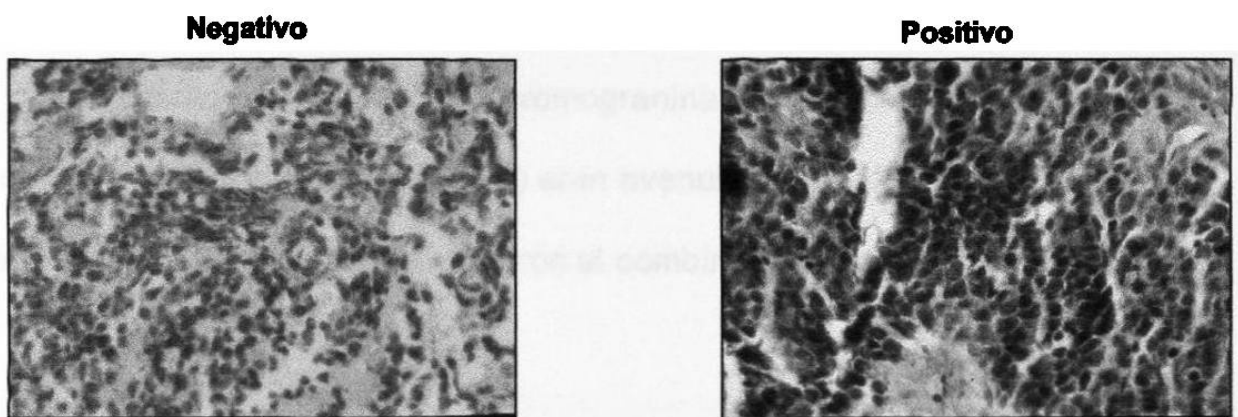


Figura 9. Expresión de ACTH (40x) . Las áreas café marrón indican la presencia del anticuerpo positivo para ACTH.

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).