

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).

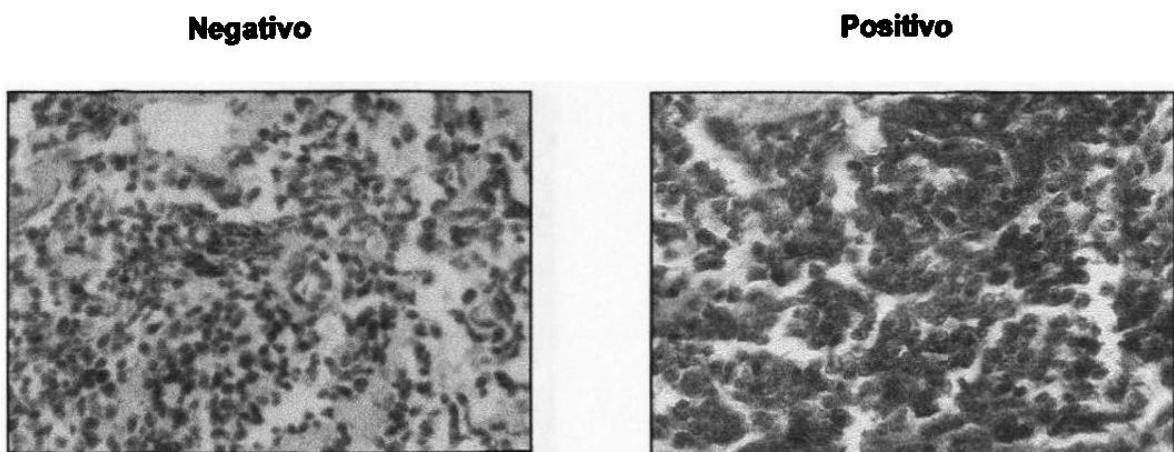


Figura 11. Expresión de Cromogranina (40X). Las áreas café marrón indican la expresión de cromogranina.

5.3.4 Expresión de citoqueratinas.

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

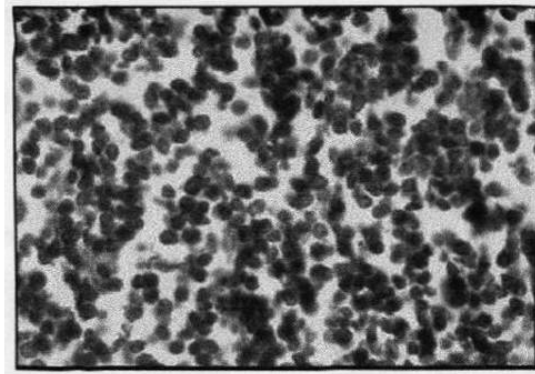


Figura 12. Expresión de citoqueratinas de alto y bajo peso molecular (40X). La expresión en el 100% de los casos demuestra que esta neoplasia es de tipo epitelial.

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).

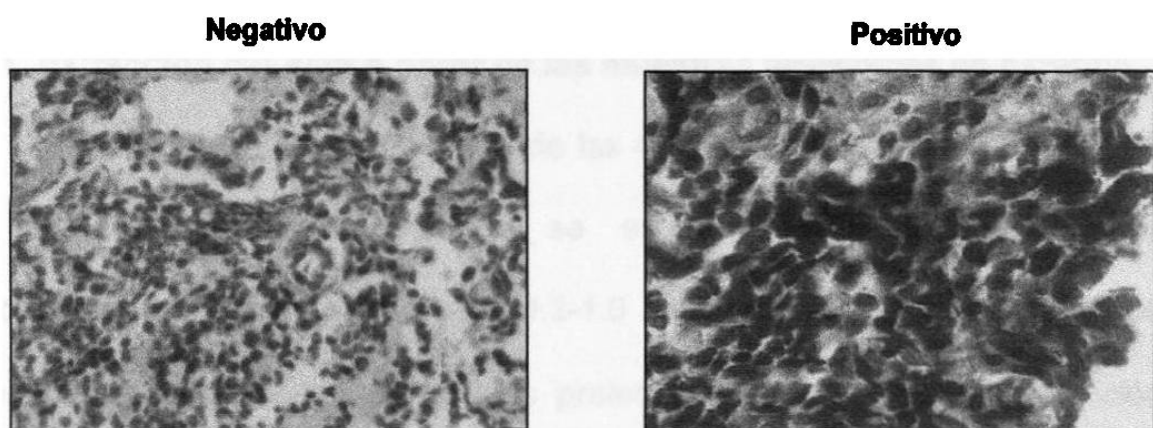


Figura 13. Expresión de c-myc (40X). Áreas café marrón indican positividad focal para c-myc.

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).

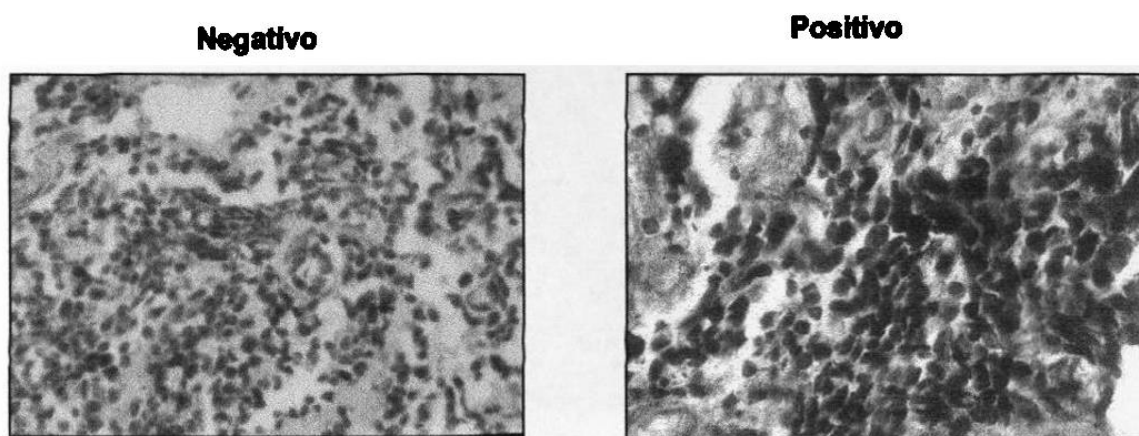


Figura 14. Expresión de p53 (40X). La positividad de p53 se observa en las áreas de color café marrón.

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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

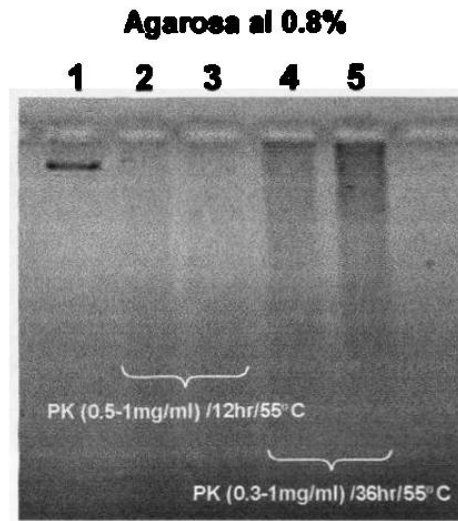


Figura 15. Análisis de ADNs. El carril 1 es un ADN estándar de concentración conocida ($100\text{ ng}/\mu\text{l}$) extraído a partir de sangre con la técnica TSNT. Los carriles 2-5 corresponden a ADNs extraídos de tejido embebido en parafina bajo condiciones diferentes en cuanto a concentración, temperatura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

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.

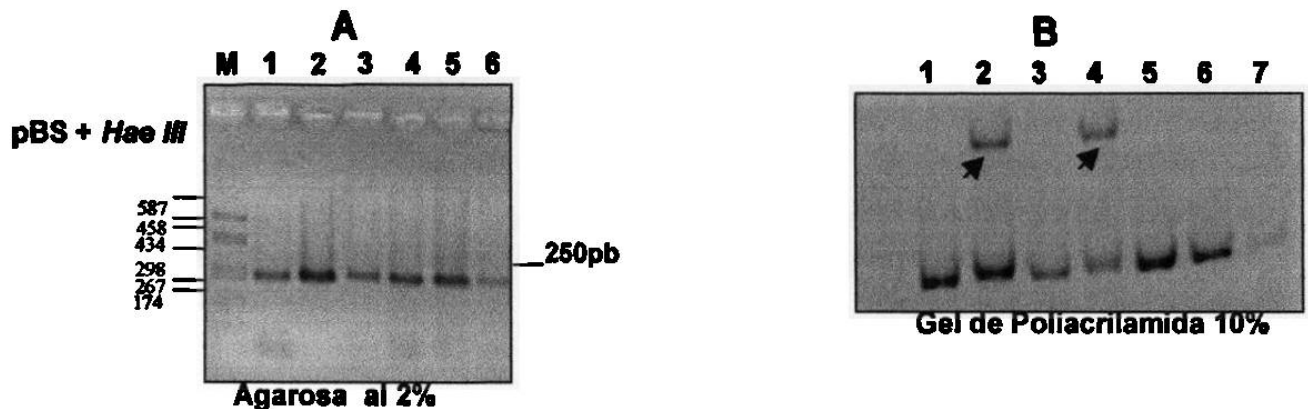


Figura 16. Análisis del exón 5 del gen p53. A) Estandarización de la PCR del exón 5, generando un fragmento de 250pb, B) Análisis del heterodúplex. Se observan homodúplex en los carriles 1, 3, 5, 6 y 7. Las flechas señalan la formación de heterodúplex en los carriles 2 y 4.

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.

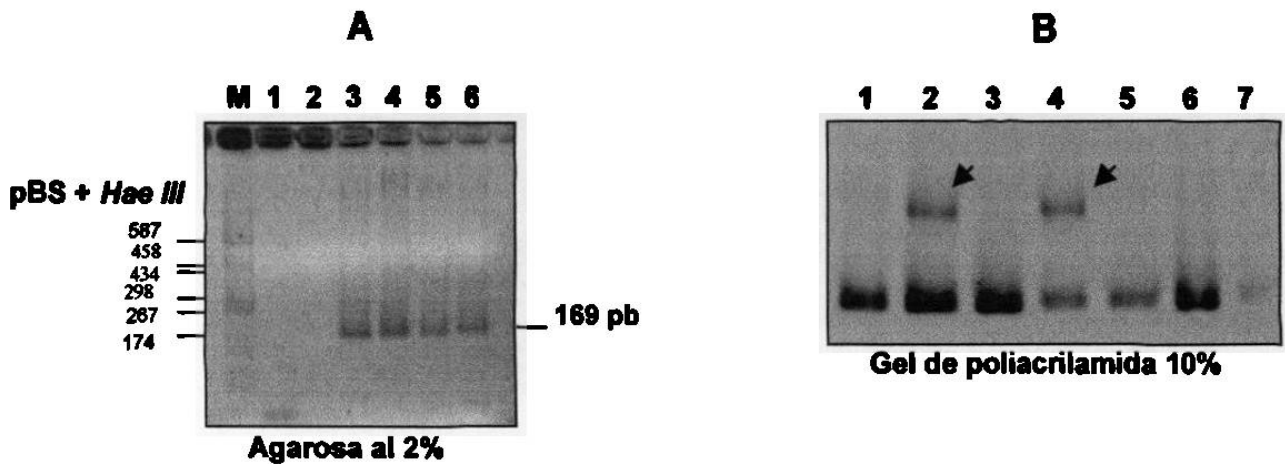


Figura 17. Análisis del exón 6 de p53. A) Estandarización de la PCR del exón 6, generando un fragmento de 169pb. B) Análisis de heterodúplex. Las flechas indican la formación de heterodúplex.

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

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.

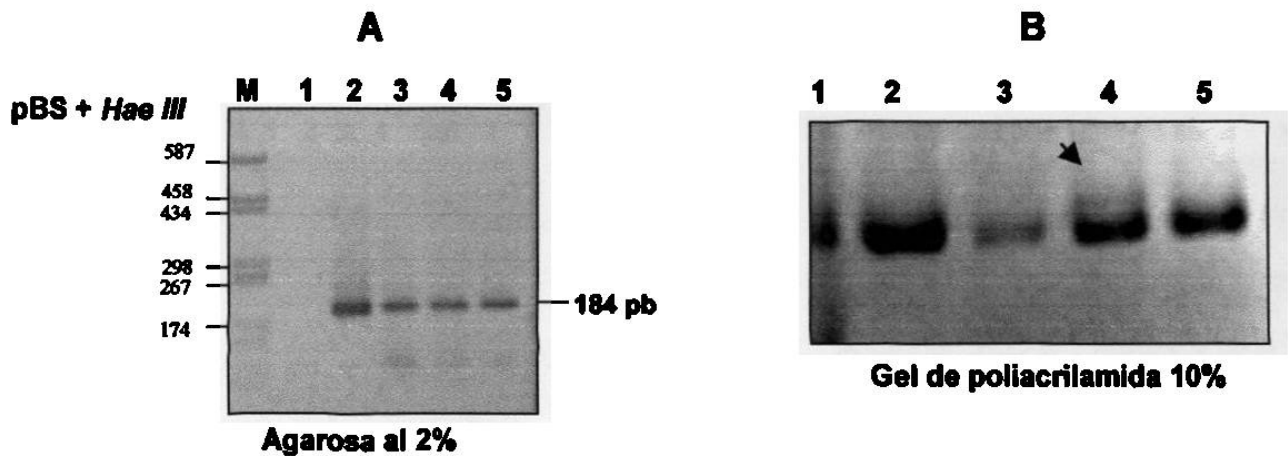


Figura 18. Análisis del exón 7 de p53. A) Estandarización de la PCR del exón 7, generando un fragmento de 184pb. B) Análisis de heterodúplex. La flecha indica la formación de heterodúplex en el carril 4.

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.

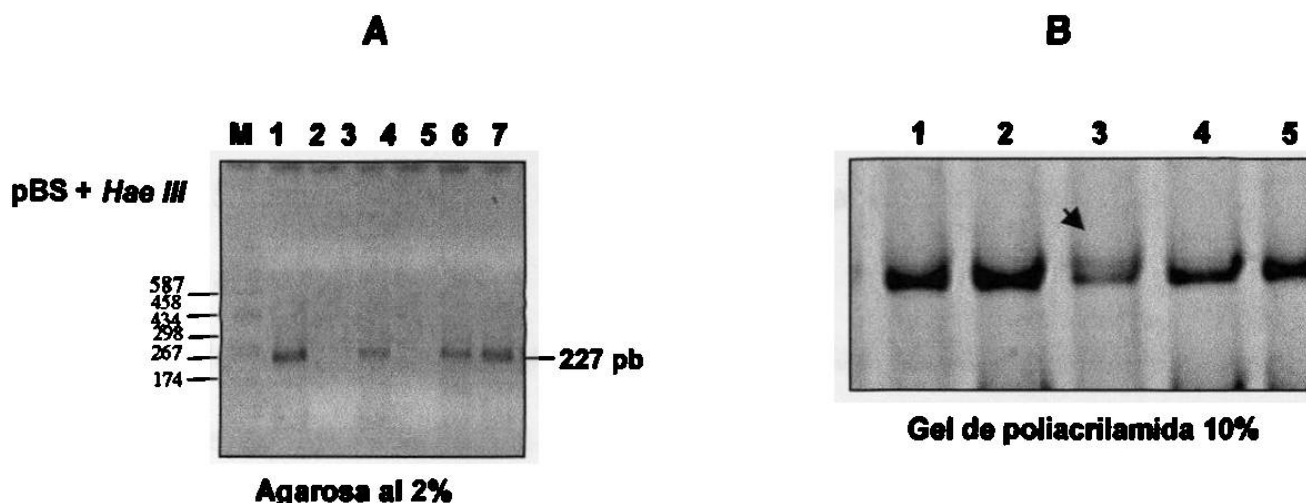


Figura 19. Análisis del exón 8 de p53. A) Estandarización de PCR del exón 8 generando un fragmento de 227pb. B) Análisis de heterodúplex. La flecha señala la formación de heterodúplex.

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.

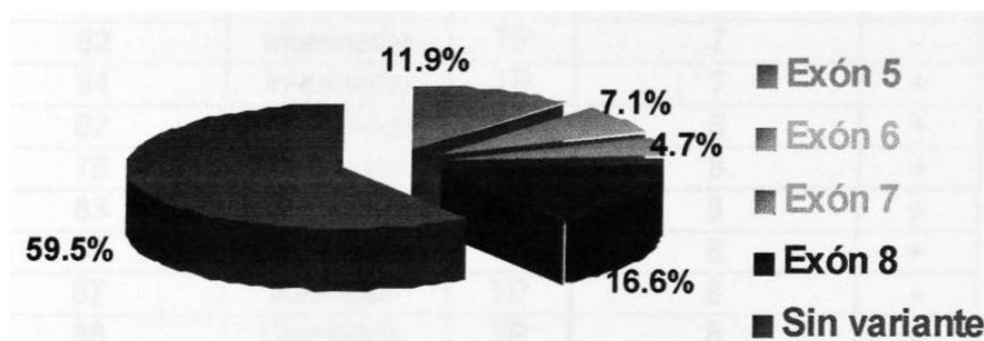


Figura 20. Frecuencia de variantes del gen p53. Se detectaron 17 variantes (40.4%), de las cuales 5 correspondieron al exón 5 (11.9%), 3 al exón 6 (7.1%), 2 al exón 7 (4.7%) y 7 al exón 8 (16.6%).

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^{72-76,81,84}. 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 descrito⁷⁸⁻⁷⁹. 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%)⁷⁸⁻⁷⁹.

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, Gazdar 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. Shirotni 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 Cardiovac 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, Bournstyn 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) Sí, 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 aviculares
b) Células intermedias
c) Células aviculares 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.**

